

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

**Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von ETS-1 in primären
Glioblastomen - Zellsubtypen-Analyse mit besonderem Augenmerk
auf Tumorzellen mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dominik Andreas Kössinger
aus München
2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Schichor

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
Prof. Dr. med. Jochen Herms

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Florian Faber

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2019

Meiner Frau und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR	6
2 EINLEITUNG	10
2.1 Gliome	10
2.1.1 Epidemiologie	10
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	11
2.1.3 Klinische Symptomatik	12
2.1.4 Diagnostik	12
2.1.5 Therapie	13
2.2 Tumorgenese	14
2.2.1 Allgemeine Mechanismen der Tumorgenese	14
2.2.2 Klonales Modell der Tumorgenese	15
2.2.3 Das „Tumorstammzellmodell“	16
2.2.4 Mesenchymale Stammzellen im Glioblastom	16
2.3 ETS-1	17
2.3.1 Transkriptionsfaktoren und ihre Bedeutung für die Genexpression	17
2.3.2 ETS-1 und die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren	18
2.3.3 Regulation von ETS-1	18
2.3.3.1 Die Regulation von ETS-1 durch Hypoxie	19
2.3.4 Funktionen von ETS-1	19
2.3.4.1 Embryonalentwicklung	19
2.3.4.2 Immunabwehr	19
2.3.4.3 Angiogenese	20
2.3.4.4 Expression und Funktion von ETS-1 in Tumoren	21
2.3.4.4.1 ETS-1-Expression in der Tumorangiogenese	22
2.3.4.4.2 ETS-1-Expression und –funktion in fibroblastischem Tumorstroma	23
2.3.4.4.3 ETS-1-Expression in Tumorzellen neuroektodermalen Ursprungs	23
2.3.4.4.3.1 ETS-1-Expression in Melanomzellen	23
2.3.4.4.3.2 ETS-1-Expression im Glioblastom	24
2.3.4.4.3.2.1 ETS-1 in Gliomzellen	24
2.3.4.4.3.2.2 ETS-1 in Gliomendothelzellen	25
3 FRAGESTELLUNG	27
4 MATERIAL UND METHODEN	28
4.1 Zellkultur	28
4.1.1 Subkultivierung der Zellen	28
4.1.2 Hypoxieversuch	28
4.2 Isolation von Zelllinien aus Gewebeproben	29
4.2.1 Vorbereitung der marker beads für die Isolierung bestimmter Zellsubtypen	29
4.2.2 Isolation von mesenchymalen Zellen mit Stammzeleigenschaften	29
4.2.2.1 Isolation von mesenchymalen Zellen mit Stammzeleigenschaften aus humanem Glioblastomgewebe	29
4.2.2.2 Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus humanem Knochenmark	31
4.2.2.3 Verifikation der Stammzellmarker der aus Glioblastomen und Knochenmark isolierten Zelllinien	31
4.2.3 Isolation von Endothelzellen aus primären Glioblastomen	31

4.4 Immunhistochemie/-zytochemie (ICH, ICC)	32
4.4.1 Fixierung der Zellen für die Immunzytochemie	32
4.4.2 Fixierung von Tumorgewebe für immunhistochemische Untersuchungen	33
4.4.3 Durchführung der immunhistochemischen/-zytochemischen Färbungen	33
4.5 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	34
4.5.1 mRNA-Isolation	34
4.5.2 Umschreibung der mRNA in cDNA	34
4.5.3 Durchführung der RT-PCR	34
4.5.4 Agarosegele für die PCR	35
4.5.5 Elektrophorese der PCR	35
4.6 Western Blot	35
4.6.1 Proteinisolation mit NP-40 Lysepuffer	35
4.6.1.1 Herstellung des Lysepuffers	35
4.6.1.2 Proteinisolation	35
4.6.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	36
4.6.1.4 Herstellung der Polyacrylamidgele	36
4.6.1.5 Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	36
4.6.1.6 Immunoblotting	37
4.6.1.7 Detektion der Proteinbanden	37
4.6.1.8 „Stripping der Membran“	37
5 ERGEBNISSE	38
5.1 Expressionsanalyse von ETS-1 in primären Glioblastomen	38
5.1.1 Expression von ETS-1 in primären Glioblastomen	38
5.1.2 Expression von ETS-1 in gbMSLC und Gliomzelllinien	41
5.2 Hypoxieversuche	44
5.2.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-Expression in Glioblastomzellen	44
5.2.2 Der Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-Expression in Glioblastomendothelzellen	49
6 DISKUSSION	53
6.1 Expression und lokale Verteilung von ETS-1 in Glioblastomen	53
6.2 ETS-1-Expression in gbMSLC und Gliomzelllinien	54
6.3 Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-Expression im Glioblastom	55
6.3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von ETS-1 in Glioblastomzellen	56
6.3.2 Dauer der Hypoxie-Exposition	57
6.4 Ausblick	57
7 ZUSAMMENFASSUNG	59
8 LITERATURVERZEICHNIS	61
9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	69
10 ANHANG	70
10.1 Geräteliste	70

10.2 Verbrauchsmaterialien	72
10.3 Zellkultur	73
10.4 Immunzytochemie/-histochemie	74
10.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	75
10.6 Western Blot	76
10.7 Antikörper	77
10.7.1 Immunhistochemie/-zytochemie	77
10.7.2 Western Blot	77
10.8 Zelllinien	77
10.9 Nährmedien	78
10.9.1 Nährmedien Zellkultur	78
10.9.2 Nährmedien Hypoxieversuche	79
10.9.3 Einfriermedium	79
10.9.4 Isolationsmedium Endothelzellen	79
10.10 Lösungen für IHC/ICC	79
10.11 Lösungen für PCR	79
10.12 Lösungen für Western Blot	80
11 PUBLIKATION	81
12 DANKSAGUNG	82
13 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	83

1 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
AML	Akute Myeloische Leukämie
Ang-2	Angiopoietin-2
AP-1	Activation Protein transcription factor 1
Aqua dest.(H ₂ O dest)	Destilliertes Wasser
bFGF	basic Fibroblastic Growth Factor
bmMSC	bone marrow-derived Mesenchymal Stem Cell, mesenchymale Stammzelle aus dem Knochenmark
BSA	Bovine Serum Albumine
CAM	chorioallantoide Membran
Ca ²⁺	Kalziumion
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
c-met	mesenchymal epithelial transition thyrosin-protein kinase, hepatocyte growth factor receptor
cMRT	kranielle Magnetresonanztomographie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREBP-binding protein	Cyclic adenosine monophosphate-response element- binding protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCS	Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular Matrix, Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ESMO	European Society of Medical Oncology
EtOH	Ethanol

ETS-1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
ETS-2	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
EvG-Färbung	Elastika van Gieson-Färbung
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
F-18-FET-PET	F-18-Fluoro-Ethyl-Tyrosin-PET
F18-FLT-PET	F-18-Fluororothymidin-PET
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GBM	Glioblastom
gbMSLC	glioblastoma-derived Mesenchymal Stem-Like Cell, aus einem Glioblastom isolierte Zelle mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften
GnT-V	N-Acetylglucosaminyltransferase V
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Wasserstoffchlorid
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HOPE	HEPES-Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
HRP	Horseradish-Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells, aus Nabelschnurgewebe isolierte humane Endothelzellen
IDH 1	Isocitratdehydrogenase 1
IDH 1mut	Isocitratdehydrogenase 1 mutiert
IDH 2	Isocitratdehydrogenase 2
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IGF	Insulin-like Growth Factor
kD	kilo Dalton
mA	Milliampere
min	Minute
MGMT	O6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase

MMP	Matrixdegradierende Metalloprotease
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymal Stem Cell, mesenchymale Stammzelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	Nonoxynol-40
O ₂	Sauerstoff
p53 ^{wt}	wild type p53
p53 ^{mut}	mutant p53
Pax	Paired box genes
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep/Glut	Penicillin/Streptavidin/Glutamin
PDGF	Platelet-Derived endothelial Growth Factor
PET	Positron Emission Tomography
PFA	Paraformaldehyd
PhIC	Phosphatase Inhibitor Cocktail
PLGF	Placenta-Like Growth Factor
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
sec	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
s.o.	siehe oben
SP-1	Specificity Protein 1
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TB-Puffer	Transfer-Pufferlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumor Necrosis Factor α

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TUEC	Tumor Endothelial Cell (Tumorendothelzelle)
U/min	Umdrehungen pro Minute
uPA	Urokinase-type Plasminogen Actvator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
µg	Microgramm
µl	Microliter
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 Einleitung

2.1 Gliome

Gliome stellen die häufigsten primären Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) dar [1]. Der Name leitet sich von ihrem neuroepithelialen Ursprungsgewebe, den Gliazellen ab. Die Gliazellen haben neben einer Stütz-, Halte- und Isolations-Funktion für Neurone auch eine wichtige Rolle in der funktionellen Signalverarbeitung des Zentralen Nervensystems sowie in der Erhaltung der Homöostase und des Stoffwechsels des Gehirns [2].

Gliome wurden erstmals 1926 von Bailey und Cushing nach histopathologischen Kriterien klassifiziert [3]. Entsprechend der zuletzt 2016 aktualisierten Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden Gliome nach histopathologischen Malignitätskriterien in vier Grade eingeteilt [4]. „Low Grade Gliome“ (WHO °I und °II), weisen eine vergleichsweise gute Zelldifferenzierung, und somit eine hohe morphologische Ähnlichkeit mit Gliazellen auf. WHO °I-Gliome sind aufgrund ihres umschriebenen, überwiegend verdrängenden Wachstumsmusters grundsätzlich durch Komplettresektion heilbar. Ihre Resektabilität ist jedoch von Ihrer anatomischen Lage und Nachbarschaft zu oder Einbeziehung von funktional essentiellen Hirnregionen abhängig. Aus diesem Grund entziehen sich bereits WHO °II-Gliome meist der kurativen chirurgischen Therapie, da sie früh das umliegende Hirnparenchym diffus infiltrieren [5, 6]. Die niedriggradigen malignen Gliome weisen aufgrund ihres eher langsamen Progresses oftmals einen langen klinischen Verlauf auf [1]. Hiervon unterschieden werden höhergradige Neoplasien, sogenannte „high grade Gliome“ (WHO °III und °IV). WHO °III-Tumore sind durch vermehrte zytologische Anaplasiezeichen mit erhöhter Proliferationsrate und diffus infiltrativem Wachstumsmuster charakterisiert. Hierdurch bedingt findet man häufig eine perifokale Ödembildung. Das Glioblastom wird als aggressivstes Gliom (WHO °IV) klassifiziert und ist durch weitere Malignitätscharakteristika wie Neoangiogenese und Tumorgewebsnekrosen gekennzeichnet [7]. Entsprechend der neuen WHO-Klassifikation von 2016 werden Gliome weiter nach molekulargenetischen Kriterien in Untergruppen eingeteilt [4]. Hierauf wird im Verlauf näher eingegangen. Diverse hereditäre Erkrankungen wie das Cowden-, Turcot-, Lynch- und Li-Fraumeni-Syndrom und die Neurofibromatose Typ I sind mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Gliomen assoziiert [6].

Im Folgenden wird näher auf das Glioblastom, den häufigsten malignen Tumor glialer Genese, eingegangen.

2.1.1 Epidemiologie

Glioblastome machen 55,4% aller Gliome und 46,6% aller primären malignen ZNS-Tumore aus [1]. Laut der im Jahr 2016 veröffentlichten Statistik des CBTRUS-Reports liegt die Inzidenz von Glioblastomen gemessen an der Gesamtbevölkerung in den USA bei 3,20 pro

100.000 Einwohnern [1]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 64,0 Jahren [1]. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter an und erreicht mit 15,27 pro 100.000 Einwohnern in der Altersgruppe der 75 bis 84-Jährigen ihr Maximum [1]. Das Erkrankungsrisiko ist für Männer statistisch 1,57-fach höher als für Frauen [1]. Trotz moderner multimodaler Therapiekonzepte ist die Überlebensprognose der Patienten stark limitiert. Unter maximaler Therapie nach aktuellem Goldstandard, bestehend aus möglichst radikaler Tumoresektion, gefolgt von einer kombinierten Radiochemotherapie beträgt das mediane Überleben 14,6 Monate [8]. In der Gesamtpopulation liegt das durchschnittliche 1-Jahres-Überleben bei 39,3%, das 5-Jahresüberleben bei 5,5% sowie das 10-Jahresüberleben bei 2,9% [1].

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Histologisch zeigt sich in Glioblastomen ein heterogenes Bild mit erhöhter Zelldichte, zahlreichen Kernpolymorphismen, deutlich erhöhter mitotischer Aktivität sowie strichförmigen und flächenhaften Nekrosearealen mit randständig pseudopalisadenförmig angeordneten Zellverbänden [9]. Des Weiteren zeigt sich eine gesteigerte Gefäßproliferation neben meist multiplen Einblutungen [10]. Der Tumor infiltriert diffus das umliegende Hirnparenchym. Eine vollständige chirurgische Tumoresektion ist daher nicht möglich [10]. Glioblastome sind meist in der subkortikalen weißen Substanz der Großhirnhemisphären, insbesondere im Bereich des Frontal- und Temporallappens lokalisiert [1]. Die Wachstumsrichtung der Gliome orientiert sich vornehmlich an den Faserbahnen, weshalb zunächst kein größerer struktureller Schaden am umliegenden Gewebe verursacht wird [11]. In bis zu 10% der Fälle zeigt sich bei Diagnosestellung ein multifokales Auftreten [12]. In 15 bis 25% der Fälle finden sich Metastasen im Bereich der inneren und äußeren Liquorräume [11]. Eine extrathekale systemische Metastasierung wird praktisch nicht beobachtet [13]. Bei einer Auswertung der Obduktionsergebnisse von Glioblastompatienten zeigte sich eine bihemisphärische Ausdehnung in etwa der Hälfte der Fälle [14].

Klinisch werden Glioblastome in primäre, *de novo* entstehende Glioblastome, und sekundäre, aus niedriggradigeren Gliomen entstehende Glioblastome unterteilt [4]. Auch wenn primäre und sekundäre Glioblastome prinzipiell während des gesamten Lebens auftreten können, weisen sie jeweils eine charakteristische Altersverteilung auf. Während primäre Glioblastome vornehmlich in der 6. bis 7. Lebensdekade auftreten, findet sich eine erhöhte Inzidenz sekundärer Glioblastome in der 5. bis 6. Lebensdekade [12].

Molekulargenetisch entsprechen primäre Glioblastome meist Glioblastomen vom IDH-Wildtyp, während sekundäre Glioblastome oft eine Mutation des Gens, welches für die Isocitratdehydrogenase (IDH) 1 und 2 kodiert, aufweisen [4]. Während die Mutation bei sekundären Glioblastomen in über 80% der Fälle nachweisbar ist, zeigt sie sich in primären Glioblastomen nur in ca. 10% der Fälle [15, 16]. Die IDH-Mutation ist mit einem verlängerten

medianen Überleben vergesellschaftet [17, 18]. Eine IDH-Mutation ist darüber hinaus oft mit Mutationen des p53-Gens und Deletionen auf den Chromosomen 1p/19q assoziiert [17]. Es wird angenommen, dass diese genetischen Alterationen in der frühen Gliomgenese auftreten [19]. Mit der Einführung der neuen WHO-Klassifikation 2016 werden sämtliche Tumore mit einer 1p/19q Deletion unabhängig vom histologischen Bild als Oligodendrogliom klassifiziert [4]. Oligodendrogliome sprechen prinzipiell besser auf Radio- und Chemotherapien an und haben einen prognostisch günstigeren Verlauf [6].

Klinisch relevanten Einfluss auf das Therapieansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid hat das DNA-Reparaturprotein O6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT) [20]. Eine Hypermethylierung von MGMT, welche man häufiger in sekundären, teils aber auch in primären Glioblastomen findet, führt zu einer verminderten Fähigkeit des Tumors, durch Chemotherapeutika induzierte DNA-Schäden zu reparieren [21]. Dementsprechend kann bei Patienten mit nachgewiesener MGMT-Promotormethylierung durch die Therapie mit Nitroseharnstoffen wie Temozolomid ein verlängertes progressionsfreies Intervall und ein verbessertes medianes Überleben erreicht werden [22].

2.1.3 Klinische Symptomatik

Die initiale klinische Symptomatik von Patienten mit einem Glioblastom ist oftmals unspezifisch. Während etwa 40% der Patienten erstmals mit einem Krampfanfall symptomatisch werden, zeigen andere Patienten kognitive Störungen wie einen raschen Abbau intellektueller Fähigkeiten, Verwirrheitszustände, Gedächtnisverlust, Persönlichkeitsveränderungen oder Apathie [23]. Die klinische Symptomatik ist abhängig von der Lokalisation des Tumors. Je nach Lage können fokalneurologische Defizite wie Hirnnervenausfälle oder sensomotorische Defizite der Extremitäten auftreten [24, 25]. Des Weiteren kommt es durch das rasch progrediente Wachstum mit Infiltration des Nachbargewebes und begleitender peritumoröser Ödembildung zu einer intrakraniellen Drucksteigerung. Diese geht mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Nüchternerebrechen und Übelkeit einher [23].

2.1.4 Diagnostik

Bei entsprechender klinischer Symptomatik erfolgt die initiale Verdachtsdiagnose aufgrund bildgebender Verfahren wie Computer- oder Magnetresonanztomographie. Die kranielle Magnetresonanztomographie (cMRT) wird favorisiert, da sie aufgrund der besseren räumlichen Auflösung in verschiedenen Sequenzen, insbesondere unter Verwendung von Kontrastmittel, eine zuverlässigere Abgrenzung der einzelnen Hirnstrukturen sowie eine präzisere Differenzierung gegenüber anderen intrakraniellen Prozessen erlaubt [6]. Radiologisch zeigen Glioblastome charakteristischer Weise einen girlandenförmigen

Kontrastmittelaustritt in der Tumorperipherie [26]. Auch nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren wie F-18FET-PET- oder F18-FLT-PET-Untersuchungen gewinnen zur besseren Abgrenzung des Tumors vom umliegenden Hirngewebe sowie zur Differenzierung hinsichtlich eines etwaigen sogenannten „Pseudoprogresses“ nach Bestrahlung an Bedeutung [25, 27]. Eine endgültige diagnostische Sicherung des Tumors bedarf jedoch einer histopathologischen Untersuchung nach offener oder stereotaktischer Gewebeentnahme [6].

2.1.5 Therapie

An einem Glioblastom erkrankte Patienten benötigen eine multimodale Therapie. Die aktuellen Leitlinien der *Eupoean Society of Medical Oncology* (ESMO) empfehlen die Festlegung der jeweiligen Therapie für jeden Patienten individuell durch ein interdisziplinäres Gremium, bestehend aus Neurochirurgen, Onkologen, Strahlentherapeuten, Neuropathologen und Neuroradiologen [6]. Der derzeitige Goldstandard der Glioblastomtherapie fußt auf drei Grundsäulen. Da eine histopathologische Diagnosesicherung notwendig ist, wird primär eine möglichst radikale funktionserhaltende Resektion angestrebt. Ist dies, zum Beispiel aufgrund der Lage oder der Ausdehnung des Tumors nicht möglich, sollte die Diagnose zumindest durch eine stereotaktische Biopsie histopathologisch gesichert werden [6]. Anschließend erfolgt eine Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion, und sofern bei den Patienten eine MGMT-Promotormethylierung vorliegt, eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid für sechs Zyklen. Die EORTC-NCIC Studie zeigte einen Überlebensvorteil für Patienten, die eine Radiochemotherapie mit Temozolomid erhielten gegenüber Patienten, die postoperativ nur eine adjuvante lokale Bestrahlung erhielten [28]. Das mediane Überleben nach radikaler Resektion aller Kontrastmittel aufnehmenden Tumoranteile und adjuvanter Radiochemotherapie beträgt 14,6 Monate [8].

Im Folgenden wird näher auf die verschiedenen Säulen der Therapie eingegangen. Die, soweit möglich, radikale chirurgische Resektion stellt den Hauptpfeiler der Glioblastomtherapie dar. Ziele eines derartigen Eingriffs sind die Diagnosesicherung sowie eine schnelle Tumormassereduktion zur Besserung der eventuell bestehenden Hirndrucksymptomatik, der Verkleinerung des später notwendigen Bestrahlungsfeldes sowie der Verbesserung der Erreichbarkeit der verbleibenden Tumorzellen für Chemotherapeutika [29]. Die Ergebnisse mehrerer Studien belegen eine positive Korrelation des Resektionsausmaßes mit der Überlebensprognose [30-33]. Durch Zuhilfenahme von 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA) und Fluoreszenzmikroskopen konnte in den letzten Jahren die Resektionsgenauigkeit und dadurch das Outcome (postoperative Morbidität, rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben, etc.) der Patienten verbessert werden [34]. Auch im Falle

eines Rezidivs propagieren manche aktuelle Behandlungsempfehlungen, sofern Tumorlage, -größe und klinischer Zustand des Patienten dies erlauben, eine erneute Tumoresektion, da hierdurch wiederum ein verlängertes Überleben erreicht werden kann [35]. Einheitliche Therapieempfehlungen zur Behandlung von Glioblastomrezidiven liegen jedoch nicht vor [6]. Daher werden in der Rezidivsituation Therapieentscheidungen in interdisziplinären Tumorboards jeweils individuell empfohlen.

Neben der chirurgischen Resektion stellt die Bestrahlung den zweiten Hauptpfeiler der Glioblastomtherapie dar. Da in 80 bis 90% der Fälle Rezidive in einem Abstand von bis zu 2cm zur ursprünglichen Tumorlokalisation auftreten, erfolgt die adjuvante Bestrahlung meist lokal, da somit im Tumorbett eine höhere Gesamtstrahlendosis erreicht und gleichzeitig Nebenwirkungen vermindert werden können [36-38]. Aktueller westlicher Therapiestandard ist eine intensitätsmodulierte Bestrahlungstherapie mit einer Gesamtstrahlendosis von 60 Gray [39]. In einzelnen Zentren kommen auch teils stereotaktische Brachytherapien sowie Bestrahlungen per Gamma Knife zur Anwendung [40-42].

Neuere adjuvante Chemotherapieprotokolle mit intensivierter oder dauerhaft fortgeführter Temozolomidgabe oder in Kombination mit Cilengitide oder Bevacicumab erbrachten in Phase-III-Studien keinen Überlebensvorteil, wobei bei Bevacicumab ein verlängertes progressionsfreies Intervall beobachtet wurde [43-46]. In der Auswertung der BELOB-Studie zeigte sich in der Phase-II-Studie eine Überlegenheit einer Kombinationstherapie aus Lomustin, einem alkylierenden Nitroseharstoff, und Bevacicumab hinsichtlich der 9-Monatsüberlebensrate bei Patienten mit Rezidivglioblastomen gegenüber den Kontrollgruppen, die eine Monotherapie mit den jeweiligen Medikamenten erhielten [47]. Dieser Effekt ließ sich jedoch in der angeschlossenen Phase III-Studie nicht bestätigen [48].

2.2 Tumorgenese

2.2.1 Allgemeine Mechanismen der Tumorgenese

Bei der Tumorentstehung durchläuft eine eukariote Zelle mehrere Phasen, während derer es zu einer Anhäufung genetischer Alterationen kommt [49, 50]. Am Anfang der Tumorgenese steht die Phase der „Initiation“. Hierbei führt eine Noxe, wie beispielsweise ionisierende Strahlung, chemische Verbindungen oder kanzerogene Viren, zu einer irreversiblen Schädigung der DNA, die von den zelleigenen Reparaturmechanismen nicht behoben werden kann [51, 52]. Treten diese Schädigungen in aktiv transkribierten Genomabschnitten, und hierbei insbesondere in Bereichen die für Transkriptionsfaktoren, Wachstumsinhibitoren oder Proteine der Zellzykluskontrolle kodieren auf, ist das Risiko einer Entartung der betroffenen Zelle deutlich gesteigert. So wurde insbesondere bei Kolonkarzinomen, jedoch auch bei anderen soliden Tumoren beschrieben, dass Mutationen des Tumorsuppressorgens

p53 in präinvasiven Vorstufen zu Aneuploidie und strukturellen Änderungen von Chromosomen führen [53]. Diese Schäden werden als „onkogene Potenz“ bezeichnet [54, 55]. Für eine spätere Entartung einer menschlichen Zelle bedarf es je nach Ursprungsgewebe vier bis zwölf somatischer Mutationen an unterschiedlichen Stellen des Genoms [56]. Hiervon ausgehend wird postuliert, dass zwischen Tumorinitiation und Tumormanifestation eine Latenzzeit von bis zu zwanzig Jahren liegen kann [49]. Während der Latenzzeit wird die Phase der sogenannten „Promotion“ durchlaufen [57]. Diese beinhaltet den Prozess vom persistierenden genetischen Defekt der Zelle zur vollständigen Entartung derselben. In dieser Zeit wirken weitere Noxen auf die Zelle ein, die als „Promotoren“ bezeichnet werden [57]. Die Promotoren induzieren eine, oftmals reversible, erhöhte mitotische Aktivität der Zellen. Ohne vorangegangene Initiation führt diese jedoch nicht zur Entartung der Zelle. Je ausgeprägter die Promotion verläuft umso kürzer ist die Latenzphase. In dieser Phase können auch sogenannte Cofaktoren (wie Humane Papilloma Viren und Hormone) weitere Schädigungen der DNA auslösen und somit eine maligne Entartung begünstigen [58-60]. Mehrere Cofaktoren können auch synergistische Effekte entwickeln. Als letzter Schritt der Tumorgenese folgt die Phase der „Progression“. Hierbei proliferieren die entarteten Zellen nun unkontrolliert, bilden oftmals knotige Zellverbände und migrieren in das umgebende Gewebe [49]. Bei vielen Tumorentitäten kommt es im Verlauf zu Absiedlungen in andere Organe sowie zu einer Invasion in Blut- und Lymphgefäße. Dieser Schritt wird als Metastasierung bezeichnet und bestimmt oftmals die Prognose der Patienten [61]. Ob diese Phasen prinzipiell von jeder Zelle durchlaufen werden können oder von bestimmten, sogenannten „Tumorstammzellen“ ausgeht wird gegenwärtig in verschiedensten Tumorentitäten erforscht. Im Folgenden wird auf beide derzeit diskutierte Modelle näher eingegangen.

2.2.2 Klonales Modell der Tumorgenese

Das 1976 von Nowell erstmals beschriebene klonale Modell der Tumorentstehung geht davon aus, dass alle Tumorzellen gleichrangig sind und, soweit teilungsfähig, der Ursprung neuer Tumore sein können [51]. Im Laufe der Tumorprogression entstehen nach diesem Modell durch weitere Erbgutveränderungen polyklonale Zellen, denen neue, für den Tumor teilweise auch günstige Eigenschaften wie eine geringe Antigenität oder ein verbessertes Migrationspotential zu eigen sind [51]. Hierdurch kann sich der Tumor an seine lokalen Umgebungsbedingungen anpassen [62]. Die Anpassung ist mit einer Mikroevolution zu vergleichen. Das Auftreten von Rezidiven nach chemo- und oder strahlentherapeutischer Behandlung mit einer erhöhten Resistenz der Karzinome wird mit der klonalen Selektion von Zellen erklärt, die diese Resistenzen im Rahmen der konsekutiven Erbgutveränderungen erworben haben [52].

2.2.3 Das „Tumorstammzellmodell“

Die Theorie, dass sogenannte Tumorstammzellen für das meist nur eingeschränkte Ansprechen von malignen Tumoren auf Chemotherapien und für das Auftreten von Rezidiven verantwortlich sind, wurde 1997 zuerst von Bonnet und Dick bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) beschrieben [63]. Sie zeigten, dass bei der AML eine funktionelle Hierarchie der Zellen vorliegt und einige wenige Zellen, welche stammzelltypische Eigenschaften, wie die Fähigkeit zu Selbsterneuerung, Differenzierung zu Subzelltypen und Proliferation besitzen, für die leukämische Transformation und somit für den Tumorprogress verantwortlich sind [63].

In mehreren Karzinomentitäten z.B. des Kolons, der Prostata, der Mamma und des Pankreas wurden Tumorstammzellen beschrieben [64-67].

Auch in Gliomen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen tumorigene, zur Selbsterneuerung fähige Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften beschrieben [68-72]. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft werden „Tumorstammzellen“ auch für Rezidive von Glioblastomen nach Temozolomidgabe verantwortlich gemacht [73]. Die Resistenz von Glioblastomen gegen Strahlentherapie wird ebenfalls auf „Tumorstammzellen“ zurückgeführt [74]. Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft besitzt die Tumorstammzelltheorie Gültigkeit für das Glioblastom.

2.2.4 Mesenchymale Stammzellen im Glioblastom

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente adulte Stammzellen, welche unter anderem dem Fettgewebe, Knochenmark oder Nabelschnurblut entstammen können [75]. Die 2006 von der International Society for Cellular Therapy definierten Kriterien für multipotente mesenchymale Stammzellen beinhalten primär, dass die Zellen unter normalen Kulturbedingungen adhärent auf Plastik wachsen und die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren [76]. Gleichzeitig dürfen die Zellen folgende Marker nicht aufweisen: CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR [76]. Als drittes Kriterium wird die Differenzierungsfähigkeit zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten definiert [76]. Unter physiologischen Bedingungen spielen MSC unter anderem in der Wundheilung eine Schlüsselrolle, wo sie die Inflamationsreaktion modulieren und Wachstumsfaktoren sezernieren [77].

Des Weiteren wird das Vorkommen von MSC in malignen soliden Tumoren beschrieben [78]. Diese werden aus dem Knochenmark rekrutiert [78]. Wie der 2017 veröffentlichte Review von Lee et.al. „Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential“ verdeutlicht, ist die Datenlage zu Ihrer Rolle in der Tumorprogression bisher noch uneindeutig [75]. MSC werden sowohl protumorigene als auch antitumorigene Eigenschaften zugeschrieben. So wurde für das Glioblastom einerseits beschrieben, dass MSC die Proliferation und die Expression von Stammzellmarkern von Tumorstammzellen

fördern, während andere Arbeiten zeigen, dass MSC Glioblastomstammzellen in die Seneszenz und Differenzierung treiben [79, 80]. Darüber hinaus gibt es Arbeiten, die sowohl eine proangiogene als auch eine antiangiogene Funktion von MSC im Glioblastom beschreiben [81, 82]. Während der proangiogene Effekt jedoch für aus Glioblastomen isolierte MSC beschrieben wurde, wurde die Studie, die den antiangiogenen Effekt beschrieb, mit MSC von gesunden Spendern durchgeführt. Somit ist es durchaus denkbar, dass die pro- oder antitumorigenen Eigenschaften von MSC eventuell unter der Kontrolle anderer Einflussfaktoren des Tumormikromilieus stehen können. Die genaue Charakterisierung von MSC in Tumoren und der Unterschiede zu MSC unter physiologischen Bedingungen bedarf einer weitergehenden Erforschung, da für MSC von gesunden Spendern im Zusammenhang mit Glioblastomen weitere vielversprechende antitumorigene Eigenschaften wie die Induktion von Apoptose in Tumorzellen oder die Inhibition der Invasivität der Tumore beschrieben wurden [83, 84]. Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen kann zur Entwicklung potentieller neuer Therapieansätze genutzt werden.

2.3 ETS-1

2.3.1 Transkriptionsfaktoren und ihre Bedeutung für die Genexpression

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die von eukariontischen RNA-Polymerasen zur Bindung an die DNA-Matrize sowie für die Initiation der RNA-Transkription benötigt werden [85, 86]. Unterschieden werden allgemeine, ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren, die die Bindung der RNA-Polymerase an die basalen Promotorelemente ermöglichen, sowie spezifische Transkriptionsfaktoren, die an distale Promotorelemente binden und einen regulatorischen Effekt auf die Transkriptionsrate ausüben [85]. Entsprechend ihrer Funktion werden diese als „enhancer“ oder „silencer“ bezeichnet [85]. Die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren variiert im Gegensatz zu der Expression allgemeiner Transkriptionsfaktoren je nach Zellart, Gewebe und Mikromilieu. Das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren wird durch die räumliche Struktur sowohl des Transkriptionsfaktors, als auch der abzulesenden DNA-Matrize und durch die Präsenz begünstigender oder inhibierender Cofaktoren beeinflusst [85].

Aktuell wird davon ausgegangen, dass im menschlichen Genom etwa 2600 Transkriptionsfaktoren angelegt sind [87]. Je nach Expression dieser Transkriptionsfaktoren in einzelnen Zellen unterscheiden sich diese in ihren Eigenschaften, wie der Teilungsfähigkeit oder der Fähigkeit, im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse in benachbartes Gewebe zu migrieren. Daher haben einige Transkriptionsfaktoren

eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren wird den spezifischen Transkriptionsfaktoren zugerechnet. [88].

2.3.2 ETS-1 und die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren

ETS-1 ist ein Transkriptionsfaktor mit vielfältigen Funktionen. Die „E26 transformation specific sequence“ oder kurz E-Sequenz wurde von Leprince und Nunn bei der Untersuchung des aviären Erythroblastose Virus E26, welches gemeinsam mit *v-myb* eine Erythrämie, eine Erkrankung aus dem Formenkreis der akuten myeloischen Leukämien (AML), im Huhn induziert, 1983 erstmals als potentiell Onkogen beschrieben [89, 90]. Watson zeigte 1985, dass auf den humanen Chromosomen 11 und 21 homologe, für die ETS-Sequenz kodierende Areale liegen, welche beide aktiv transkribiert werden [91]. Die Sequenz auf Chromosom 11 wurde ETS-1, die Sequenz auf Chromosom 21 ETS-2 genannt [91]. Mittlerweile sind mehr als 35 Mitglieder der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren bekannt [92]. Sie alle teilen die ETS-Domäne, eine „helix-turn-helix“-DNA-Bindungsdomäne, die aus 85 Aminosäuren besteht und an die Konsensussequenz GGAAT (ETS-Binding Sequence EBS) bindet [93].

ETS-1 wird vornehmlich nukleär exprimiert. Die hierfür verantwortliche Kernlokalisationssequenz liegt am C-terminalen Ende der ETS-Sequenz [94]. In diversen Zellen wie ruhenden Endothelzellen, sowie Zellen von Endometrium- und Ovarialkarzinomen wurde ETS-1 jedoch auch vorrangig im Zytoplasma nachgewiesen [95, 96].

2.3.3 Regulation von ETS-1

Eine Transaktivierung oder Transrepression von ETS-Transkriptionsfaktoren kann durch die Interaktion mit anderen Proteinen, die Phosphorylierung interner Regulationsdomänen durch Proteinkinasen oder Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden, welche zu Acetylierung oder einer posttranslationalen Modifizierung führen, erfolgen [97-99].

ETS-Transkriptionsfaktoren interagieren mit weiteren Schlüssel-Transkriptionsfaktoren wie AP-1, SP-1, NF κ B, CREBP-binding protein/p300, Pax oder anderen Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie [98, 100-102].

Eine wichtige Rolle bei der Regulation von ETS-1 kommt auch dem Tumorsuppressorgen p53 zu. So bindet sowohl wild type p53 (p53^{wt}) als auch mutant p53 (p53^{mut}) an ETS-1. Jedoch ist nur p53^{wt} in der Lage, die durch ETS-1 begünstigte Expression von Thromboxansynthase, welcher antiapoptotische und invasivitätsbegünstigende Eigenschaften in diversen Malignomen zugeschrieben werden, in diversen humanen Gliomzelllinien zu hemmen [103]. p53-Mutationen finden sich in 27% der IDH Wildtyp und 81% der IDH-mutierten Glioblastome [4].

ETS-1 unterliegt auch einer Regulation durch Ubiquitinierung und Sumoylierung [88]. SUMO

und Ubiquitin sind 8-12kD große Proteine, die im Rahmen komplexer Regulationsprozesse durch Lysinreste an andere Proteine binden, und dadurch die Funktion sowie Degradation derselben modulieren können [88, 104].

2.3.3.1 Die Regulation von ETS-1 durch Hypoxie

In der Literatur existieren unterschiedliche Beschreibungen hinsichtlich des Einflusses von Hypoxie auf die ETS-1-Expression von Zellen. So wurde in verschiedenen Karzinomzelllinien eine Steigerung der ETS-1-Expression durch Hypoxie beschrieben. Von Mamori et al. konnte eine gesteigerte ETS-1-Expression unter hypoxischen Bedingungen in der HCC-Zelllinie FLC-7 gezeigt werden [105]. Oikawa et al. demonstrierten für die Urothelkarzinomzelllinie T24 eine durch HIF-1 modulierte, erhöhte ETS-1-Expression unter hypoxischen Bedingungen [106]. Ähnliche Ergebnisse beschrieben sie zudem für eine Zelllinie aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) [106]. Eine im Jahr 2015 veröffentlichte Arbeit von Qiao et al. zeigte jedoch, dass Hypoxie in murinen Pankreaszellen nur zu einer transienten Steigerung der ETS-1-mRNA-Expression führt, während die ETS-1-Proteinexpression jedoch sinkt oder unverändert bleibt [107]. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse ist anzunehmen, dass der Effekt von Hypoxie auf die ETS-1-Expression gewebsspezifisch ist. Entsprechende Untersuchungen für gliale Tumore liegen bislang nicht vor.

2.3.4 Funktionen von ETS-1

ETS-1 ist unter den Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie am genauesten charakterisiert. Eine Expression findet man in verschiedenen Zelltypen und Geweben. Dort ist es in eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse involviert [88, 96]. Im Folgenden wird auf die wesentlichen Funktionen eingegangen.

2.3.4.1 Embryonalentwicklung

Da ETS-1 erstmals im Rahmen der viralen Genese der Erythrämie beim Huhn beschrieben wurde, wurde primär die Rolle von ETS-1 in der normalen Huhn-Embryogenese untersucht [108, 109]. Hier zeigte sich, dass die ETS-1-Expression auf spezifische Entwicklungsstadien und –schritte der Embryogenese limitiert ist [108]. So wurde eine ETS-1-Expression insbesondere in hämatopoetischen Inseln des Dottersacks, sowie in Endothelzellen im Rahmen von Vaskulo- und Angiogenese nachgewiesen [110]. ETS-1 wird auch im Rahmen physiologischer Prozesse wie der Brustdrüsenentwicklung und der Migration von Zellen der Neuralleiste in der Embryogenese exprimiert [88, 111, 112].

2.3.4.2 Immunabwehr

ETS-1 wird bei Erwachsenen unter physiologischen Bedingungen insbesondere in lymphoiden Geweben nachgewiesen. So weisen B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und NK-T-Zellen eine relevante ETS-1-Expression auf [104, 113]. Untersuchungen an ETS-1-knockout-

Mäusen zeigten verschiedene Defekte der T-Zell-Entwicklung, wie eine aberrante Thymusdifferenzierung, verminderte periphere T-Zellzahl, verminderte Interleukin-2-Produktion sowie Differenzierungsstörungen [114]. Auch ist ETS-1 für die Expression von CD127 in peripheren T-Zellen nötig. Ein Mangel an CD127 führt zu einer verminderten Lebensdauer der Zellen sowie zu einer Unfähigkeit zur Vermehrung von T4-Helferzellen nach Übertragung auf einen lymphopenen Wirt [104, 114]. Bei regulatorischen T-Zellen führt ein ETS-1-Mangel sowohl zu einer Reduktion der absoluten Zahl als auch zu funktionellen Einschränkungen der vorhandenen regulatorischen T-Zellen [115]. Auch bei CD8-positiven T-Zellen führt ein ETS-1-Mangel zu Zellenentwicklungs- und Funktionsstörungen [104, 114].

In ETS-1-knockout-Mäusen wurden zudem auch in der B-Zell-Differenzierung verschiedene Abweichungen beobachtet. Ob diese aufgrund einer intrinsischen Ursache oder durch die Veränderungen der T-Zellen bedingt sind ist jedoch unklar. Die auffälligste Veränderung gegenüber ETS-1-wild-type-Mäusen ist eine vermehrte Differenzierung in IgM- und IgG-sezernierende Plasmazellen, die sich in peripheren lymphoiden Organen und dem Knochenmark in hohem Maße ansammeln [104]. ETS-1-knockout-Mäuse wiesen im Gegensatz zu den Kontrolltieren deutlich erhöhte Titer an Autoimmunantikörpern sowie inflammatorische Prozesse in Lunge und Leber auf, die mit einer Autoimmunreaktion vereinbar sind [116]. Ein ETS-1-Mangel scheint auch beim Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, Psoriasis und Zöliakie zu begünstigen [104].

ETS-1 ist auch für die Bildung und Funktionsfähigkeit Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) unabdingbar. So ist in ETS-1-Knockout-Mäusen unter anderem sowohl die Zahl der NK-Zellen, als auch der NK-Vorläuferzellen in Knochenmark, Thymus, Milz und Leber erniedrigt, sowie die zytolytische Aktivität der vorhandenen Zellen vermindert [104].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ETS-1 eine wichtige regulatorische Rolle in Zelldifferenzierung sowie bei der funktionellen Regulation der lymphatischen Immunabwehr spielt.

2.3.4.3 Angiogenese

Die Angiogenese ist bei Säugetieren ein essentieller physiologischer Vorgang, der jedoch auch im Rahmen pathologischer Prozesse auftreten kann [117]. So tritt sie in der Embryonalentwicklung sowie postnatal im Rahmen der Wundheilung, der Geweberegeneration und im Rahmen des weiblichen Menstruationszyklusses in der reproduktiven Phase auf [118]. Unter physiologischen Bedingungen ist die Gefäßneubildung aufgrund fein justierter aktivierender und hemmender Signalkaskaden zeitlich begrenzt. Vascular endothelial growth factor (VEGF) wird allgemein als wichtigster proangiogener Faktor angesehen. VEGF bindet an spezifische Rezeptorthyrosinkinasen, von denen im menschlichen Endothelzellen drei spezifische Subtypen VEGF-R1-3 exprimiert werden [119]. Aktivierung dieser Rezeptorthyrosinkinasen kommt es zu erhöhter Endothelzellproliferation,

Endothelzellmigration und Neoangiogenese [119]. Unter pathologischen Bedingungen wie entzündlichen Erkrankungen und in der Tumorgenese entfällt die zeitliche Begrenzung dieses Vorgangs [120]. Die hierdurch bedingte, konstant aktivierte Neoangiogenese ist für die Tumorentwicklung und das Tumorwachstum bereits ab einer Größe von 1-2 mm³ unabdingbar [121].

Die Regulation sowohl physiologischer als auch pathologischer Angiogenese wurde in mehreren Arbeiten mit dem ETS-1-Transkriptionsfaktor in Verbindung gebracht [108, 110, 122-125]. In weiterführenden Versuchen konnte eine Induktion von ETS-1 in Endothelzellen durch direkte und indirekte angiogene Faktoren wie VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) belegt werden [88, 126, 127]. ETS-1 selbst reguliert in Endothelzellen die Expression von Genen, die für Proteine kodieren, welche essentiell für die Degradation der Extrazellulärmatrix (ECM) sind. Zu diesen gehören urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) und verschiedene matrixdegradierende Metalloproteasen (MMPs), welche für die Invasion im Rahmen der frühen Angiogenese notwendig sind [125]. Darüber hinaus ist ETS-1 an der Regulation von Genen, die für Integrine, Cadherine und Zelladhäsionsmoleküle (ICAM) kodieren beteiligt [128-130]. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und -migration.

Eine Inhibition von ETS-1 durch Antisense-Oligonukleotide hemmt in *in vivo*-Modellen des Huhns die Angiogenese [131]. *In vitro* lässt sich überdies durch eine Inhibition von ETS-1 mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden die Expression von VEGF, HGF und c-met reduzieren [88, 132-134].

Aufgrund seiner Schlüsselrolle unter den Proangiogenesefaktoren ist ETS-1 neben VEGF ein potentieller Ansatzpunkt für eine zielgerichtete antiangiogenetische Therapie. Durch die Applikation von Fumagillin, Genistein oder Isoflavonen lässt sich *in vitro* in HUVEC die VEGF-vermittelte ETS-1-Expression inhibieren und *in vivo* im Tiermodell die Angiogenese hemmen [88].

2.3.4.4 Expression und Funktion von ETS-1 in Tumoren

ETS-1 wird von diversen soliden Tumoren, darunter gynäkologischen Tumoren wie Mammakarzinomen und Endometriumkarzinomen, Tumoren des Gastrointestinaltrakts wie Colon-, Magen- und Ösophaguskarzinomen, Sarkomen, malignen Melanomen sowie Astrozytomen exprimiert [88, 96].

Die ETS-1-Expression lässt sich hierbei in den Tumorzellen selbst sowie in tumorassoziierten Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese und Fibroblasten, nachweisen [110, 125, 135, 136]. Diese Zellen stellen wesentliche Faktoren des

Tumormikromilieu dar [137]. Tumorassoziierte Fibroblasten spielen durch die Sekretion verschiedener Proteasen eine wesentliche Rolle bei der Matrixdegradation und Tumorinvasion [125].

Die Expression von ETS-1 steigt in zahlreichen Tumorarten mit Malignisierung an, oder tritt erst in invasiven höhergradigen Tumorstadien auf [96]. Dies gilt auch für Gliome [138].

In vielen Tumoren finden sich neben der vollständigen Isoform P51 verschiedene ETS-1-Splicingvarianten. In Gliomen hingegen wird praktisch ausschließlich die vollständige Isoform P51 beobachtet [139, 140].

2.3.4.4.1 ETS-1-Expression in der Tumorangiogenese

Bereits in den frühen Phasen der Tumorgenese kommt es zum so genannten „angiogenetic switch“ wenn Tumoren die Größe von 1-2 mm überschreiten [121]. Hierbei kommt es zu einem Übergewicht proangiogener Faktoren im Tumormikromilieu [141]. Zu den hierbei exprimierten Faktoren, welche nicht nur von den Tumorendothelzellen, sondern auch von Zellen des Tumorstromas exprimiert werden können, zählen unter anderem VEGF, Placenta-like growth factor (PLGF), platelet-derived endothelial growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) und Angiopoietin-2 (Ang-2) [88, 142].

Eine ETS-1-Expression wird regelmäßig im Rahmen der Vaskularisierung benigner wie maligner Tumore wie u.a. Mamma- Ovarial-, Kolon- Lungen- und klarzelligen Nierenkarzinomen beobachtet [135, 137, 143, 144]. Eine ETS-1-Expression findet sich im Kapillaren im Mammakarzinom bereits in präinvasiven Stadien [135].

Antiangiogene Therapieansätze sind ein neues vielversprechendes Instrument der Krebstherapie und aktuell Gegenstand vieler klinischer Studien. [145-147]. Viele Mechanismen der Tumorangiogenese sind derzeit jedoch noch unverstanden, weshalb die Ergebnisse für verschiedene Tumorentitäten differieren. Während z.B. bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom eine Therapie mit Bevacicumab das progressionsfreie Intervall sowie durchschnittliche Überleben signifikant verlängern konnte, konnte bei Patienten mit Glioblastom nur das progressionsfreie Intervall, nicht jedoch das Gesamtüberleben verlängert werden [43, 148, 149].

Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass eine funktionelle Inhibition von ETS-1 durch transviral induzierte Expression einer Dominant-negativen ETS-1-Mutante sowohl die physiologische Angiogenese, als auch die Angiogenese von Tumoren und deren initiales Wachstum hemmt [124]. Hierbei wurden keine wesentlichen Organschädigungen der Tiere beobachtet [124]. Der Tierversuch zeigte jedoch auch, dass das Tumolvolumen der Behandlungsgruppe nach 25 Tagen annähernd die Größe der Kontrollgruppe erreicht hatte [124]. Ob der Effekt, wie von den Autoren postuliert, auf eine nachlassende Effizienz der retroviralen Transfektion oder auf einen anderen Mechanismus zurückgeführt werden kann,

bedarf der endgültigen Klärung. Dennoch bleibt ETS-1 aufgrund der wenigen beobachteten Nebenwirkungen im Tiermodell und seiner zentralen Rolle in der Angiogenese ein potentieller Ansatzpunkt für weitere experimentelle Therapieansätze [88].

2.3.4.4.2 ETS-1-Expression und –funktion in fibroblastischem Tumorstroma

ETS-1 wird nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von stromalen Zellen unter physiologischen wie pathologischen Bedingungen exprimiert. So ist eine ETS-1-Expression sowohl nur in mesenchymalen Zellen in räumlicher Nähe zu physiologisch einwandernden epithelialen Strukturen im Embryo als auch in stromalen Fibroblasten, die invadierendes Tumorgewebe umgeben, beschrieben [88, 109]. Diese Expression scheint durch die Sekretion bestimmter Zytokine mediert zu werden, die Tumorzellen in Richtung Tumorstroma sezernieren. So wurden verschiedene Zytokine wie bFGF und PDGF identifiziert, die ETS-1 in kultivierten Fibroblasten induzieren [88].

Unter den bisher identifizierten ETS-1-Zielgenen befinden sich mit uPA sowie verschiedenen Metalloproteasen wie Collagenase IV (MMP2 und 9) und Stromelysin 1 (MMP3), wichtige proteolytische Enzyme, die in die Matrixdegradation maligner invasiver Prozesse involviert sind [88, 125]. In verschiedenen Tumoren findet sich eine räumliche Kolo-kalisation von ETS-1 und diversen Metalloproteasen [88, 125]. Neben der Schlüsselfunktion hinsichtlich der Matrixdegradation reguliert ETS-1 auch diverse Gene, die eine wichtige Rolle beim Remodelling der Matrix einnehmen. So konnte gezeigt werden, dass in humanen Vorhautfibroblasten Proteoglycane wie Lumican, Decorin und α -2-Typ-I-Collagen ETS-1-abhängig gebildet werden [150].

Auch wenn das genaue Verständnis der exakten Rolle von ETS-1 hinsichtlich der extrazellulären Matrix noch weiterer Untersuchungen bedarf lässt sich zusammenfassend bereits feststellen, dass ETS-1 eine zentrale Rolle sowohl in der Degradation als auch im Remodelling der extrazellulären Matrix und somit eine wichtige regulierende Rolle in Kernprozessen des Tumorwachstums und -infiltration einnimmt.

2.3.4.3.3 ETS-1-Expression in Tumorzellen neuroektodermalen Ursprungs

ETS-1 ist in Tumorzellen unterschiedlicher embryonaler Herkunft nachweisbar. Hierzu gehören auch Tumorzellen neuroektodermalen Ursprungs [88]. Wichtige Vertreter maligner Tumore dieser Gruppe sind maligne Melanome, deren Vorläuferzellen (Melanozyten) aus der Neuralleiste stammen, und Gliome, die aus Gliazellen entstehen. Gliazellen entstammen dem Neuralrohr [88].

2.3.4.4.3.1 ETS-1-Expression in Melanomzellen

Maligne Melanome weisen eine hohe ETS-1-Expression auf. Das Clark-Level als indirektes Maß der Invasivität von Melanomen korreliert hierzu nicht [151]. Auch in hämatogenen

Melanommetastasen zeigt sich eine hohe ETS-1-Expression [151]. In niedriger malignen Vorstufen ist die ETS-1-Expression analog zu Befunden in anderen Tumoren wie Mamma-Ovarial- und Cervixkarzinom geringer [96, 151]. In Melanomzelllinien werden uPA, MMP1, MMP3 sowie das Integrin $\beta 3$ durch ETS-1 reguliert [151]. Die Expression dieser Proteine in Melanomzelllinien sinkt unter ETS-1-knockdown [151]. Auch das Migrationspotential von Melanomzellen ist nach ETS-1-Inhibition im Boyden chamber invasion assay deutlich herabgesetzt [151].

2.3.4.4.3.2 ETS-1-Expression im Glioblastom

In Hirngewebe gesunder Spender konnte von Amouyel et al. 1988 in Astrozyten immunhistochemisch eine generelle Expression von Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie nachgewiesen werden [152]. Ein spezifischer Nachweis von ETS-1 auf mRNA- oder Proteinebene gelang den Autoren jedoch im Gegensatz zu aus Gliomen isolierten Zellen nicht [152]. In späteren Untersuchungen zeigte sich, dass in Gliomen die ETS-1-Expression mit der Malignität korreliert. Vergleichsschnitte aus gesunden Gehirnen zeigten ebenso wie Grad-II-Astrozytome keine ETS-1-Expression [138]. Die ETS-1-modulierte Expression von matrixdegradierenden Proteasen im Glioblastom scheint mit dem Auftreten einer p53-Mutation zu korrelieren [11, 103].

2.3.4.4.3.2.1 ETS-1 in Gliomzellen

Eine ETS-1-Expression ist in verschiedenen Gliomzelllinien beschrieben [128, 153-155]. In den kommerziell erhältlichen Zelllinien U87, U251 und T98G korreliert die ETS-1-Expression mit der uPA-Expression [154]. Des Weiteren konnte in U251 durch ETS-1-knockdown-Versuche eine Regulation der uPA-Expression durch ETS-1 nachgewiesen werden [128, 154]. Für U251 konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach Transfektion mit einer Dominant-negativen Form von ETS-1 die Invasivität in 3D-Collagengelen herabgesetzt, sowie Zelladhäsion und -migration auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen im Gegensatz zu mit Typ-I-Collagen beschichteten Zellkulturschalen eingeschränkt war [128]. Fibronectin gehört zu den Proteinen der Extrazellulärmatrix und spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich Zelladhäsion und -migration in Gliomen [156]. Auch konnte unter ETS-1-Inhibition eine verminderte Expression der mRNA der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 3$, welche eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Fibronectin haben und in Glioblastomen überexprimiert sind, nachgewiesen werden [128]. ETS-1-knockdown-U251 waren darüber hinaus im Vergleich zu den mit dem Kontrollplasmid transfezierten U251 in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Tumoren nach Implantation in Hühnerembryos eingeschränkt [128].

Die ETS-1-Expression und konsekutiv die uPA-Expression wird in T98G-Zellen durch bFGF oder FCS (fetal calf serum) gesteigert [153]. In dieser Zelllinie führt ein ETS-1-knockdown mit Antisense-Oligonukleotiden zu einem verminderten Migrationspotential der Zellen auf

Vitronectin-beschichteten Zellkulturschalen [153]. Der Effekt kann durch Stimulation mit bFGF oder FCS nicht aufgehoben werden [153].

In mehreren humanen Gliomzelllinien konnte bereits eine Korrelation zwischen der ETS-1-Expression und der Expression der N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), welche für die Biosynthese von β 1,6-N-Acetylglucosamin-tragenden N-Glycanen, die eine begünstigende Rolle bei der Invasivität von Gliomen spielen, nachgewiesen werden [155].

Die Expression von Cathepsin B, einer lysosomalen Cysteinprotease, die ebenfalls eine Rolle bei der Matrixdegradation und Tumordinvasion spielt, wird von ETS-1 zusammen mit Specificity-Protein 1 (SP-1) in U87 transaktiviert [157].

Auch Zytokine haben Einfluss auf das Bindungsverhalten von ETS-1. So konnte in T98G-Zellen gezeigt werden, dass durch Interferon- γ die Bindungsaffinität von ETS-1 im Promotorbereich von TNF- α und hierdurch die Expression der MMP3 gehemmt werden konnte [158].

In der Ratten-Gliomzelllinie C6 wurde ebenfalls eine Expression von ETS-1 nachgewiesen [159, 160]. Durch einen ETS-1-knockdown mittels doppelsträngiger Antisense-Oligodeoxynukleotide konnten Sahin et al. in dieser Zelllinie sowohl die Expression der MMP9, welche eine wesentliche Rolle bei der Infiltration von Gliomen *in vitro* und im Xenograft-Tiermodell spielt, als auch die Zellproliferationsrate vermindern [160]. In weiterführenden Versuchen konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass auch ein retroviraler ETS-1-Knockout in C6-Gliomzellen zu einer signifikant erniedrigten Proliferationsrate führt [160]. Des Weiteren war die Migrationsfähigkeit der Knockout-Zellen im Vergleich zur transfezierten Kontrollzellpopulation sowohl im Wound healing Assay als auch in Fibronectin- wie Collagen-Typ-I als auch mit Matrigel beschichteten Boyden Chambers herabgesetzt [159]. Das Wachstum der Glioblastomzellen *in vivo* an der chorioallantoiden Membran des Hühnereiembryos (CAM) war ebenfalls vermindert [159]. Zusammenfassend konnten Sahin et al. zeigen, dass ETS-1 in der C6-Gliomzelllinie eine wichtige Funktion in mehreren, für die Entwicklung, Invasion und Proliferation maligner Tumore essentiellen, Prozessen spielt.

2.3.4.4.3.2 ETS-1 in Gliomendothelzellen

In aus Glioblastomen isolierten Tumorendothelzellen konnte sowohl eine ETS-1-Expression als auch eine Korrelation der ETS-1-Expression mit einer Expression des VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1), nicht jedoch des VEGF-Rezeptors-2 (VEGFR-2) nachgewiesen werden [140]. Valter et al. beschrieben, dass die ETS-1-Expression von kapillären Endothelzellen in der Umgebung von VEGF-sezernierenden Gliomzellen erhöht war [140].

Durch Stimulation mit VEGF und TNF α , nicht aber mit HGF lässt sich in HUVEC die ETS-1-Expression bis auf das fünffache steigern [134, 140]. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass durch ETS-1-antisense-Nukleotide *in vitro* in HUVEC das invasive Potential vermindert werden kann, da sowohl die Expression von uPA und MMP-1 als auch die VEGF-

induzierte Migration durch Matrigel oder Gelatinmembranen vermindert werden [134]. ETS-1 scheint somit eine wesentliche Rolle sowohl in der physiologischen wie der pathologischen Angiogenese des ZNS zu spielen.

Je nach Aktivierungsgrad wechselt in Gliomendothelzellen der Ort der ETS-1-Expression. Während in aktivierten Endothelzellen mit epitheloider Morphologie die ETS-1-Expression hauptsächlich nukleär zu beobachten ist findet man ETS-1 in ruhenden, flächig anmutenden Endothelzellen hauptsächlich im Zytoplasma [140].

Die in Astrozyten und Gliomzelllinien hauptsächlich nachgewiesene ETS-1 Isoform P51 unterliegt einer Ca^{2+} -abhängigen Phosphorylierung, welche durch Neurotransmitter wie Glutamat, Bradykinin und Norpinephrin ausgelöst werden kann [139]. In der murinen Teratomzelllinie P19 wurde eine ETS-1-Expression im Rahmen der neuronalen Differenzierung nachgewiesen [139].

3 Fragestellung

Das rasche, diffus infiltrative Wachstumsmuster von Glioblastomen stellt sowohl für die operative Resektabilität als auch für eine Radiochemotherapie den limitierenden Faktor dar.

In astrozytären Tumoren ist analog zu diversen anderen Tumoren, wie Mammakarzinomen, Kolonkarzinomen und Sarkomen eine Assoziation der Expression des ETS-1-Protoonkogens mit einem erhöhten Malignitätsgrad beschrieben. In verschiedenen nicht glialen Tumorentitäten konnte nachgewiesen werden, dass eine ETS-1-Expression einen unabhängigen negativen prognostischen Marker für das Überleben der Patienten darstellt [96].

ETS-1 hat als Transkriptionsfaktor diverse protumorigene Eigenschaften. So begünstigt seine Expression die Migrations- und Wachstumsfähigkeit von Tumorzellen. Dies wurde ebenfalls für Gliomzelllinien gezeigt [128, 159]. Zudem stellt ETS-1 neben VEGF einen wichtigen Angiogenesefaktor dar. Für manche, nicht gliale Tumorentitäten ist eine Hypoxieabhängigkeit der ETS-1-Expression beschrieben [105, 106].

Über die ETS-1-Expression und deren Regulation in primären Glioblastomen liegen bisher nur wenige Arbeiten vor. Da in Glioblastomen aufgrund des raschen Wachstums trotz ausgeprägter Neoangiogenese ein stark hypoxisches Milieu mit Ausbildung von Nekrosen herrscht, ist das Ziel dieser Arbeit eine genauere Charakterisierung des Einflusses von Hypoxie auf die ETS-1-Expression in primären Glioblastomen.

In einem ersten Schritt sollten daher ETS-1-positive primäre Glioblastome identifiziert werden. In weiteren Schritten sollten die lokale Verteilung der ETS-1-Expression untersucht, sowie ETS-1-positive Subzelltypen identifiziert werden. Hierbei liegt das besondere Augenmerk auf tumoreigenen mesenchymalen Zellen mit Stammzeleigenschaften, da dieser Zellpopulation sowohl protumorigene als auch antitumorigene Eigenschaften zugeschrieben werden und ihre Rolle in der Pathogenese des Glioblastoms noch nicht vollständig verstanden ist.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die erhöhte ETS-1-Expression in primären Glioblastomen ein Anpassungsschritt an das hypoxische Tumormilieu ist, oder eventuell eine hypoxieunabhängige maligne Alteration der Tumoren darstellen kann.

4 Material und Methoden

Die Versuche für diese Arbeit wurden von 2010 bis 2012 im tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik an der Klinik der LMU München, Standort Großhadern, durchgeführt.

4.1 Zellkultur

Die Lagerung der verwendeten Zellen erfolgte in Stickstofftanks in Kryoröhrchen in DMEM, welches mit 40%FCS/20%DMSO versetzt war. Um die Zellen wieder zu kultivieren, wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in einem Wasserbad bei 37°C circa eine halbe Minute aufgetaut und direkt danach in eine mit 10ml Medium befüllte 75cm²-Kulturflasche gegeben um die toxische Wirkung des DMSO soweit als möglich zu minimieren. Für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen wurde das Medium samt Zellen mehrfach sorgfältig resuspendiert. Danach wurde die Flasche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 24 Stunden nach dem Auftauen erfolgte ein kompletter Nährmediumwechsel ohne Spülen mit sterilem PBS. Das Zellwachstum wurde alle 2-3 Tage mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach drei bis vier Tagen wuchsen die Zellen als adhärente Monolayer. Weitere Nährmedienwechsel erfolgten alle drei bis vier Tage. Das Medium wurde jeweils komplett abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Die Zelllinien wurden im Rahmen des Mediumwechsels im Gegensatz zu den selbst isolierten Zellen mit sterilem PBS gespült. Das Arbeitsvolumen betrug bei 75cm²-Flaschen 10ml, bei 25cm²- respektive 150cm²-Flaschen 5 bzw. 25ml.

4.1.1 Subkultivierung der Zellen

Sobald sich im Lichtmikroskop zeigte, dass die Zellen einen weitestgehend konfluenten Monolayer gebildet hatten, erfolgte eine Ablösung dieser von der Flasche durch Inkubation mit 0,05% Trypsin/EDTA für ca. 1min. Nach Resuspension in den Flaschengrößen entsprechender Menge Nährmedium wurde der Übertrag in neue Kulturflaschen durchgeführt. Für die verschiedenen Versuchsansätze wurde die Zellsuspension bei 20°C bei 1200U/min zentrifugiert und die Zellzahl mithilfe von Trypanblau und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden hierfür nach Zählung jeweils in 75cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Für Versuche wurden von Endothelzellen und Zelllinien je 1x10⁶ pro Flasche ausgesät, von gbMSLCs oder bmMSC jeweils 5x10⁵ pro Flasche.

4.1.2 Hypoxieversuch

Die Zellkulturflaschen wurden 48 Stunden nach Bestückung mit einer festgesetzten gleichen Zellzahl nach oben beschriebenem Verfahren und einer lichtmikroskopischen Kontrolle, ob sie einen konfluierenden Monolayer gebildet hatten, mit PBS gespült und mit 10ml FCS- und Wachstumsfaktorfreiem Medium versetzt. Dann wurde jeweils eine Kulturflasche unter 37° C,

5%CO₂, und 21%O₂, die andere unter 0,1%O₂ bei ansonsten identischen Bedingungen inkubiert. Nach weiteren 48h wurden die Zellen nach lichtmikroskopischer Kontrolle trypsinisiert, mit sterilem PBS, welches mit 10% FCS versetzt war, für 5min bei 1200U/min abzentrifugiert, zur Entfernung von Medium- und FCS-Resten zwei Mal in 10ml sterilem PBS resuspendiert und wiederum zentrifugiert bevor direkt im Anschluss Proteine oder RNA isoliert wurden.

4.2 Isolation von Zelllinien aus Gewebeproben

4.2.1 Vorbereitung der marker beads für die Isolierung bestimmter Zellsubtypen

Die marker beads wurden je nach der erwarteten Zellmenge (Idealverhältnis 1 zu 5) in ein Eppendorf-Cup pipettiert und für 1min in den Magneten gestellt bis die Lösung klar war. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipetiert und verworfen ohne die beads aufzuwirbeln. Das Eppendorf-Cup wurde nun aus dem Magneten genommen und mit 1000µl PBS/0,1% BSA resuspendiert. Das Eppendorf-Cup wurde wiederum in den Magneten gestellt bis der Überstand klar war, dieser abgenommen und verworfen. Das Eppendorf-Cup wurde aus dem Magneten genommen, die beads in der ursprünglichen Menge PBS/ PBS/0,1% BSA resuspendiert und 0,2-05µg Antikörper pro 10⁷ (25µl) beads zugegeben. Bei der Isolation von mesenchymalen Zellen mit Stammzeleigenschaften wurden hierbei CD133-Antikörper, bei der Isolation von Endothelzellen CD31- und CD34-Antikörper verwendet. Das Gemisch wurde nun in einem Eppendorf-Cup für 30min bei Raumtemperatur bei Stufe 6 in den Dynal-Rotator gegeben und inkubiert. Danach wurde das Eppendorf-Cup für 1min in den Magneten gestellt, bis die Lösung klar war. Der Überstand wurde verworfen und die gecoateten beads in 1000µl PBS/0,1% BSA resuspendiert. Hierauf wurde das Eppendorf-Cup wieder in den Magneten gestellt. Dieser Waschgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Danach wurden die gecoateten beads in der ursprünglichen Menge PBS/0,1% BSA aufgenommen. Die so gebrauchsfertigen beads wurden bis zu ihrer Verwendung (s.u.) bei Raumtemperatur unter der Sterilbank gelagert.

4.2.2 Isolation von mesenchymalen Zellen mit Stammzeleigenschaften

4.2.2.1 Isolation von mesenchymalen Zellen mit Stammzeleigenschaften aus humanem Glioblastomgewebe

Nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten und gemäß dem Votum der Ethikkommission wurde das Tumorgewebe vom operierenden Neurochirurgen intraoperativ mit Hilfe eines Mikroskopes identifiziert und mit der gebotenen Sorgfalt reseziert. Die histopathologische Begutachtung und das Grading des Tumors gemäß der WHO-Klassifikation erfolgte durch das Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung (ZNP), Klinikum der Universität München - Großhadern, München.

Unmittelbar nach Resektion wurde das Tumorgewebe unter sterilen Bedingungen auf Eis in das Labor verbracht. Unter der Laminar Air Flow Werkbank wurden sonstige Gewebebestandteile wie größere Blutgefäße, Thromben und Nekrosen unter Verwendung eines Skalpells entfernt.

Um den Tumor zu fragmentieren wurde dieser unter Zugabe von 5-10ml DMEM/20%FCS in eine Petrischale gegeben und soweit als möglich mit einem Skalpell zerkleinert. Dieses Gemisch wurde vollständig in einen Homogenisator überführt, die Petrischale nochmals mit Medium gespült, das Medium ebenfalls in den Homogenisator gegeben und das Gewebe-/Mediumgemisch im Homogenisator bearbeitet bis makroskopisch keine Gewebestücke mehr zu sehen waren. Das Homogenisat wurde in einem 50ml Falconröhrchen gesammelt und Collagenase-Dispase in einem Verhältnis von 1mg/ml zugegeben. Nach Überführung in eine 150 cm² Zellkulturflasche wurde das Gemisch 1,5-2h bei 37°C in einem Trockenschrank auf einem Schüttler unter engmaschiger mikroskopischer Kontrolle inkubiert bis die Zellen einzeln in der Suspension schwammen. Die Suspension wurde für 10min, 20°C bei 1500U/min abzentrifugiert und das Pellet in 30ml DMEM/20%FCS resuspendiert. Die Suspension wurde dann über zwei Zellsiebe von 70 und 40µm Porenweite gegeben und im Verhältnis von 2:1 in einem Falcon-Röhrchen auf HistoPak aufgeschichtet. Diese wurden für 30min, 20°C bei 1.530U/min ohne Bremse zentrifugiert. Die sich bildende Interphase wurde abgenommen und in ein neues Falconröhrchen überführt. Die Interphase wurde nun der gleichen Menge DMEM/10%FCS versetzt und unter Zuhilfenahme eines Vortex-Rüttlers gemischt. Hierauf folgte eine Zentrifugation für 10min bei 1.230U/min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml PBS resuspendiert. Hierauf wurde das Zellgemisch in einem 30µm Filter, welcher mit DPBS + 0,5% BSA vorgespült war, zusammen mit 2mM EDTA gefiltert. Das Filtrat wurde mit DPBS/0,5% BSA auf 30ml aufgefüllt und 10min bei 1330U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipetiert, das Pellet auf 500µl resuspendiert und mit F_c Blocking Reagent sowie marker beads für CD133 versetzt. Nach einer Inkubation über 30min bei 4°C im Kühlschrank wurde das Zellgemisch auf 50ml mit PBS und BSA aufgefüllt und nochmals für 10min bei 1330U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden mithilfe einer MACS-Anlage die Zellen bezüglich ihrer CD133-Expression aufgetrennt. Hierzu wurden die Filter mit 3ml PBS + BSA equilibriert und ein 50ml Falcon zum Auffangen der CD133-negativen Zellen verwendet. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 5ml PBS aufgelöst und zu gleichen Teilen über die Säulen gegeben. Die Säulen wurden je drei Mal mit PBS gewaschen. Die derart CD-133 negativ gesorteten Zellen wurden nun ein letztes Mal 10min bei 1330U/min abzentrifugiert, in einer 75cm² Zellkulturflasche mit 10ml DMEM/20%FCS resuspendiert und im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.2 Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus humanem Knochenmark

Die Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus Resten humaner Knochenmarkspenden (bmMSC) erfolgte in unserem Labor routinemäßig nach einem bereits früher unter anderem von unserer Arbeitsgruppe publizierten Protokoll [161, 162]. Die Stammzellen wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Spender der Aktion Knochenmarkspende Bayern e.V. gewonnen. Die Zellgewinnung erfolgte aus gebrauchten Spenderbeuteln, die im Rahmen der Knochenmarkspende für die Leukämietherapie anfielen. Für die Arbeit wurden den Spendern keine zusätzlichen Zellen entnommen. Die Spenderbeutel wurden direkt nach Abschluss der Zellgewinnung durch die AKB e.V. abgeholt und unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Die Beutel wurden mit 80% Ethanol desinfiziert, unter der Laminar Air Flow Bank Mit 50ml Perfusorspritzen und steriler Nadelspitze angestochen und mit 90ml DMEM/20%FCS/1%PenStrepGlut gespült. Der Durchlauf wurde über Siebe von 70µm und 40µm Größe gegeben. Danach wurden vorsichtig jeweils 30ml des Durchlaufs auf 15ml in 50ml Falcons vorgelegte HistoPak Lösung aufgeschichtet so dass sich zwei Phasen bildeten. Die Falcons wurden daraufhin bei 12°C und 1500U/min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Interphase in ein neues Falcon überführt, mit 10ml DMEM/20%FCS/1%PenStrepGlut resuspendiert und 10min bei 12°C und 1500U/min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nochmals wie vorbeschrieben resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10ml Medium resuspendiert, in eine 75cm² Zellkulturflasche überführt. Diese wurde eindeutig numeriert und beschriftet. Die bmMSC wurden nach erfolgter Charakterisierung (s. 4.2.2.3) bis Passage 10 für weiterführende Versuche verwendet.

4.2.2.3 Verifikation der Stammzellmarker der aus Glioblastomen und Knochenmark isolierten Zelllinien

Analog zu dem bereits von unserer Arbeitsgruppe publizierten Protokoll wurden die verwendeten in unserem Labor isolierten gbMSLCs und bmMSCs per FACS-Analyse charakterisiert [162]. gbMSLCs zeigten ein positives Signal für CD29, CD44, CD90 und CD105 sowie ein negatives Signal für CD34. Die isolierten bmMSC zeigten ein positives Signal für CD29, CD44, CD90, CD105 und CD146 und ein negatives Signal für CD45 und CD34.

4.2.3 Isolation von Endothelzellen aus primären Glioblastomen

Die wie oben beschrieben identifizierten Tumorproben wurde in einer Petrischale in 5 bis 10ml 4°C kaltes Isolationsmedium gegeben. Mit einem Skalpell wurden makroskopisch sichtbare Gefäße entfernt und der Tumor so weit als möglich zerkleinert. Die hierdurch entstandene Gewebesuspension wurde in den Homogenisator überführt, die Petrischale mit

5-10ml Isolationsmedium gespült, so dass man eine Gesamtmenge von 15ml erzielte. Nun wurde der Tumor im Homogenisator zerkleinert bis makroskopisch keine einzelnen Gewebestücke mehr identifizierbar waren. Das Homogenisat wurde auf 30ml aufgefüllt, in ein Falconröhrchen überführt, 556µl Collagenase zugegeben und gut durchmischt. Hierauf wurde das Homogenisat in eine große Zellkulturflasche gegeben und für ein bis zwei Stunden bei 37°C im Trockenschrank auf einem Schüttler in niedriger Stufe inkubiert, bis unter mikroskopischer Kontrolle keine Zellverbände mehr erkennbar waren. Die Suspension wurde nun mit über ein 70µm und ein 40µm Zellsieb in Falcons pipettiert. Darauf erfolgte eine Zentrifugation bei 300g für 10min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe in 500-1000µl kaltem Isolationsmedium in einem Eppendorf-Cup resuspendiert. Nun wurden die vorbereiteten (s.o.) beads zugegeben. Pro ml Zellsuspension wurden ca. 10^7 beads benötigt.

Im nächsten Schritt wurde das Zell-beads-Gemisch bei 4°C für 30min bei Stufe 6 in den Dyna I-Rotator gegeben. Nach der Inkubation wurde das Eppendorf-Cup für ca. eine Minute in den Magneten gestellt bis die Lösung klar war. Das Eppendorf Cup wurde aus dem Magneten entfernt, der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden in 500µl Isolationsmedium vorsichtig resuspendiert und in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Das ursprüngliche Eppendorf-Cup wurde mit 500µl Isolationsmedium gespült und selbiges in das neue Eppendorf-Cup überführt. Das alte Eppendorf-Cup wurde nun verworfen. Das neue Eppendorf-Cup wurde ebenfalls wie vorbeschrieben (s. 4.2.2.1) in den Magneten gestellt bis der Überstand klar war. Nun wurde der Überstand abpipetiert und verworfen. Nach Auffüllen mit 1000µl Isolationsmedium wurde dieser Waschschrift noch zwei Mal wiederholt. Die Zellen wurden abschliessend in 4ml Endothelzellmedium resuspendiert und in einer kleinen mit 2,5ml Gelatine beschichteten kleinen Zellkulturflasche im Brutschrank bei 37°C/5%CO₂ kultiviert.

4.4 Immunhistochemie/-zytochemie (ICH, ICC)

4.4.1 Fixierung der Zellen für die Immunzytochemie

Zur Durchführung immunzytochemischer Färbungen wurden die Zellen abtrypsiniert, unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer gezählt und jeweils $3-5 \times 10^4$ Zellen in 1,5 ml Medium auf einem sterilen Objektträger in einer Petrischale ausgesäht. Dieser wurde für 48h in einem Brutschrank bei 37° 5%CO₂ 100° Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Objektträger zwei Mal mit eisgekühltem PBS gewaschen und für 10min bei Raumtemperatur mit einer 3,5-3,7% PFA-Lösung bedeckt um die Zellen zu fixieren. Es erfolgten zwei weitere Waschgänge mit eisgekühltem PBS. Zur Kernpermeabilisierung wurden die Objektträger für 10min mit 0,5%iger NP40-Lösung inkubiert und erneut zwei Mal mit PBS gewaschen bevor mit den Färbungen fortgeschritten wurde.

4.4.2 Fixierung von Tumorgewebe für immunhistochemische Untersuchungen

Die Tumorstücke wurden mit dem HOPE®-Fixierungsverfahren der Firma DCS-Diagnostics gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden von den intraoperativ mikroskopisch als Tumor identifizierten Gewebeproben per Skalpell Stücke von maximal 8x8x8mm Kantenlänge geschnitten. Diese wurden dann sofort mit 0-4°C kalter HOPE® I-Lösung bedeckt. So wurden die Tumorstücke 48 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde HOPE® I entfernt und die Gewebestücke 5ml einer -20°C kalten vorbereiteten Acetonlösung (1:100 Mischung aus reinem Aceton und HOPE® II) bedeckt und sofort für 2h bei 4°C inkubiert. Folgend wurde das Aceton- HOPE® II - Gemisch abgegossen, durch reines eiskaltes Aceton ersetzt und wieder für 2h bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Nach insgesamt 8h Dehydration wurde das Aceton abgegossen und 52-54°C warmes niedrigschmelzendes Paraffin zugegeben. Die Gewebestücke wurden dann, nachdem Luftblasen weitest möglich entfernt waren, über Nacht in einen Wärmeschrank bei 54°C gegeben. Nun wurden die Schnitte mit dem warmen Paraffin in Kassetten gegeben und bei 4° C im Kühlschrank gekühlt. Dort wurden die Blöcke bis zum Schneiden aufbewahrt. Mit einem Mikrotom wurden 5 µm dicke Scheiben geschnitten und aus dem Wasserbad auf Objektträger aufgefangen. Die Schnitte wurden in konsekutiver Reihenfolge nummeriert. Die Schnitte wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.4.3 Durchführung der immunhistochemischen/-zytochemischen Färbungen

Färbungen wurden, soweit nicht anders angegeben, an konsekutiven Schnitten ausgeführt. Die Schnitte wurden zunächst für 20 min in 60° heißem Isopropanol entparaffiniert, das Isopropanol gewechselt und nochmals bei 60° für 10 min entparaffiniert. Hierauf wurden die Schnitte luftgetrocknet.

Auf Objektträgern ausgesäte Zellen wurden mit PFA fixiert sowie eine Kernpermeabilisierung mit NP40 durchgeführt (s.o.). Ab hier ist das Vorgehen analog.

Die Objektträger wurden für 10min. in -20°C kaltes 70%iges Aceton gegeben. Nun folgte ein Waschgang für 10min in Aqua dest. Zur Zellkernpermeabilisierung wurden die Schnitte hierauf für 10min mit 0,5% NP 40 bedeckt. Es folgten drei Waschgänge mit PBS für jeweils 5min. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Objektträger 10min mit Peroxidase Blocking Reagenz inkubiert. Hierauf erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBS (s.o.). Direkt hierauf wurden die Objektträger für 1h mit Protein Blocking Reagenz inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde diese abgekippt und die Objektträger über Nacht bei 4°C mit den entsprechend in Antibody Diluant verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit Antibody Diluant versetzt. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3 Mal mit Tris-Puffer/Tween20 gewaschen bevor der Sekundärantikörper aufgetragen wurde. Dieser wurde für 10min bei Raumtemperatur inkubiert bevor wieder ein

dreimaliger Waschgang mit Tris-Puffer/Tween20 folgte. Hierauf folgte eine 10minütige Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase bevor ein letzter Waschgang mit Tris-Puffer /Tween20 folgte. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden Gewebeschnitte mit Chromogen DAB gefärbt, Einzelzellfärbungen mit AEC. Bei Farbumschlag wurden die Objektträger vorsichtig mit Aqua dest. gespült und hiernach für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger teilweise für 2-5 Sekunden in Hämatoxylin getaucht und unter fließendem Leitungswasser gespült. Hierauf folgte eine aufsteigende Alkoholreihe 70% EtOH / 96% EtOH / 100% EtOH / Histol. Zum Fixieren des Deckglases wurde bei DAB-Färbungen Entellan und bei AEC-Färbungen Aquatex verwendet. Im Rahmen der mikroskopischen Begutachtung wurden repräsentative Fotografien erstellt.

4.5 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

4.5.1 mRNA-Isolation

Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet und ausgezählt. Danach wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge RLT-Lyse Buffer versetzt und durch pipettieren und vortexen resuspendiert. Dieses Lysat wurde dann in Qiashredder Spin Säulen überführt und 2min bei 16000U/min zentrifugiert. Hierauf wurde dem Durchfluss dieselbe Menge an 70% Ethanol hinzugefügt und in die RNEasy Säule überführt. Dieses Gemisch wurde für 30sec bei 16000U/min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Hiernach wurden nacheinander 700µl RW1Puffer und 500µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und >15 sec bei 16000U/min abzentrifugiert. Daraufhin wurde noch einmal 500µl RPE-Puffer beigefügt und für > 2min bei > 10000U/min zentrifugiert um die Säule zu trocknen. Der Filter mit der gebundenen RNA wurde dann auf ein RNase freies 1,5ml Eppendorf Gefäß gesetzt und je nach Zellmenge 30-50µl RNase free water auf die Säule gegeben. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurde die Säule bei > 10000U/min zentrifugiert, der Durchlauf wieder auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert.

4.5.2 Umschreibung der mRNA in cDNA

Die mRNA-Konzentration wurde mithilfe eines Eppendorf Biophotometer bei einer Wellenlänge von 320nm bestimmt. Die cDNA-Umschreibung erfolgte unter Verwendung des Qiagen QuantiTect® Reverse Transcription-Kit mithilfe eines Eppendorf Mastercycler Personal®. Hierbei wurden nach Herstellerangaben pro Reaktion jeweils 0,8µg RNA in cDNA umgeschrieben. Diese wurde bei -20°C gelagert. Überschüssige mRNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

4.5.3 Durchführung der RT-PCR

Je 2µl cDNA wurden nach Herstellerangaben mit dem Hot Star Taq Master Mix Kit im Cycler amplifiziert. Annealingtemperatur war für ETS-1 57°C, Für GAPDH 59°C. Die Zahl der Zyklen

lag für ETS-1 bei 32 (bmMSC 34), für GAPDH bei 22. Die Größe der Transkripte betrug 274bp (ETS-1) sowie 574bp (GAPDH).

Die Primersequenzen waren:

ETS-1 fwd: 5'-GTT-AAT-GGA-GTC-AAC-CCA-GC-3'

ETS-1 rev: 5'-GGG-TAG-CGA-CTT-CTT GTT-TG-3'

GAPDH fwd: 5'-TCC-AAA-ATC-AAG-TGG-GGC-GAT-GCT-3'

GAPDH rev: 5'-ACC-ACC-TGG-TGC-TCA-GTG-TAG-CCC-3'

4.5.4 Agarosegele für die PCR

Für die Elektrophorese wurden selbst gegossene 1,5% Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die Agarose abgewogen, mit der entsprechenden Menge an verdünntem TBE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle zum Aufkochen gebracht. Der Kochvorgang wird unter wiederholtem Schwenken fortgesetzt bis sich die gesamte Agarose schlieren- und blasenfrei aufgelöst hatte. Nun wurde 0,2µg EtBr/ml Gel hinzugefügt und unter sorgfältigem Schwenken vermischt. Das Gel wurde in Kammern gegossen, eventuell vorhandene Luftblasen ausgestrichen, und der Kamm eingesetzt. Sobald die Gele erkaltet waren wurden Sie entweder direkt verwendet oder bei 4°C für maximal 2 Wochen gelagert.

4.5.5 Elektrophorese der PCR

Die Proben wurden mit Loading Dye versetzt und je 2µl neben der Ladder auf den Gelen aufgetragen und in einfachem TBE-Puffer schwimmend im Gelelektrophoresesystem aufgetrennt. Die angelegte Spannung betrug 150V, Die Dauer im Durchschnitt 45-50 Minuten. Der Vorgang wurde mithilfe des Geldokumentationssystems überwacht und fotografisch dokumentiert.

4.6 Western Blot

4.6.1 Proteinisolation mit NP-40 Lysepuffer

4.6.1.1 Herstellung des Lysepuffers

Zur Herstellung des Lysepuffers wurden als Stammlösung 0,5 ml Tris/HCL 2M, 6ml NaCl 2,5 M, 10ml Glycerol 100%, 5ml Nonidet P-40 10% und 0,4ml EDTA 0,5 M, pH 8,0 mit 78,1ml Aqua dest. angesetzt, mit einem 0,45µm Filter steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Vor der Proteinisolation wurden pro ml Lysepuffer 1µl DTT 1M, 5µl PIC, 5µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 1, 5µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 5µl PMSF hinzugefügt.

4.6.1.2 Proteinisolation

Die Zellen wurden wie schon beschrieben trypsiniert, gewaschen und im Zellpellet gesammelt. Danach wurde pro 10⁶ Zellen 70µl eiskühler Lysepuffer zugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis über 10min wurde das Lysat bei 4°C für 10min bei 12000U/min

zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Cup überführt und der Zelldebris verworfen. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

4.6.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die für die Bestimmung der Proteinkonzentration nötige Eichgerade wurde durch die Vermessung von je 1µl der Protein-Standards (0-2mg/ml) im Doppelversuch kalibriert. Die Proteinstandards sowie jeweils 1µl der Proben wurden in 200µl Bradford Dye Reagenz resuspendiert und mittels Biophotometer die Extinktion bei 595nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte schließlich mithilfe der Eichgeraden ermittelt werden.

4.6.1.4 Herstellung der Polyacrylamidgele

Verwendet wurden 7,5%ige Trenn- und 4%ige Sammelgele. Vor dem Zusammensetzen wurden die Gussformen mit vollentsalztem Wasser und Ethanol gereinigt. Unter einer Abzugshaube wurden in folgender Reihenfolge in einen 50ml-Falcon 4,85 ml Aqua dest., 2,5ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8, 100µl 10%SDS, 2,50ml 30%iges Acrylamid, 50µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 5µl TEMED pipettiert und gemischt. Die Gussformen wurden mit dem hergestellten Gel befüllt und während der Polymerisation für 30min mit Isopropanol bedeckt. Die Gele wurden, sofern nicht direkt verwendet, feucht eingeschlagen, luftdicht verpackt und für maximal 24h bei 4°C gelagert. Zur Herstellung der Sammelgele wurden unter der Abzugshaube 6,10ml Aqua dest, 2,5ml 0,5M Tris/HCL pH 6,8, 100µl 10%SDS, 1,30ml 30%iges Acrylamid, 50µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 5µl TEMED in einem 50ml-Falcon gemischt. Das Sammelgel wurde nun gleichmäßig auf das in der Gussform befindliche Trenngel geschichtet bevor der Kamm eingesetzt wurde. Nach Abschluss der Polymerisation der Sammelgele, welche bei Raumtemperatur etwa 30min dauerte, wurden die Gele verwendet.

4.6.1.5 Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Blotkammern mit Gelen wurde mit kaltem Elektrophorese-Puffer befüllt und in eine eisgefüllte Wanne gestellt.

Die Proteinlysate wurden zusammen mit einer Lösung aus Lämmli-Puffer und 5% β-Mercaptoethanol für 5min bei 95°C erhitzt um die Sekundärstruktur der Proteine zu entfalten. Es wurde jeweils eine Proteinkonzentration von 1µg/µl eingesetzt.

Die Geltaschen wurden sorgfältig entweder mit 5µl des Markers Fermentas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder oder 27µl pro Probe geladen. Zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Elektrophorese wurden Taschen, welche nicht für Proben oder Ladder benötigt wurden, mit 27µl Lämmli-Puffer befüllt. Im nächsten Schritt wurde die Blotkammer für 55min an eine Stromstärke von 30mA pro Gel angeschlossen, um die Proteinlysate elektrophoretisch aufzutrennen.

4.6.1.6 Immunoblotting

Im ersten Schritt wurde die PVDF-Membran entsprechend der Größe der verwendeten Elektrophoresegele zugeschnitten. Die Membranen wurden dann für 30sec in Methanol getaucht um sie zu aktivieren und konsekutiv für 10min in TB-Puffer inkubiert. In dieser Zeit wurden die Kassetten für den Proteintransfer vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden pro Gel zwei Fiberpads vorbereitet und Whatman-Filterpapier auf die Größe der Gele zugeschnitten sowie mit TB-Puffer angefeuchtet. Im nächsten Schritt wurden die Gele in TB-Puffer aus den Kammern geloest und die Sammelgele entfernt. Die Blotkammerkassette wurde nun zusammengesetzt und mit Transferpuffer gefüllt. Zum Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Membran wurde die Kassette in eine mit Eis befüllte Wanne gestellt und für 50min an eine Spannung von 110 Volt angeschlossen.

4.6.1.7 Detektion der Proteinbanden

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Membranen mit 10ml einfachem Roti®-Block für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern in einfachem Roti®-Block bei 4°C über Nacht auf einem Rüttler. Am nächsten Tag wurden die Membranen mehrmals mit TTBS gewaschen und für 1h mit einem speziesspezifischen HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion des gesuchten Proteins erfolgte unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Verstärkersystems (1ml Immunostar Luminol Enhancer + 1ml Peroxid-Reagenz). Die Membran wurde hierfür in einer mit einem hochempfindlichen Röntgenfilm bestückten Filmkassette auf einem je nach Signalintensität für eine Dauer von ca. 5-20min inkubiert. Der Film wurde mittels eines Scopix LR 5200 Entwicklers entwickelt.

4.6.1.8 „Stripping der Membran“

Zwecks Wiederverwendung der Membranen mit einem neuen Antikörper wurden diese drei Mal mit TTBS gewaschen und bei Raumtemperatur auf einem Rüttler mit Stripping-Buffer gewaschen. Nach erneuter dreimaliger Waschung der Membranen in TTBS wurden selbige für eine Stunde bei Raumtemperatur in einfachem Roti®-Block inkubiert. Danach wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

5 Ergebnisse

5.1 Expressionsanalyse von ETS-1 in primären Glioblastomen

5.1.1 Expression von ETS-1 in primären Glioblastomen

Da in der Literatur der Anteil der ETS-1-positiven Glioblastome mit 65% (39,5% moderat positiv und 25,5% deutlich positiv) beschrieben wird [138], war der erste Schritt dieser Arbeit, ETS-1-positive primäre Glioblastome zu detektieren. In Ergänzung zu den immunhistochemischen und molekularen Befunden des Neuropathologischen Institutes der LMU München erfolgten HE-Färbungen und immunhistochemische Färbungen zur Bestimmung des IDH-1-Status sowie für ETS-1 (s. Abb. 1). Sämtliche untersuchten Tumore waren primäre Glioblastome.

Aus den so identifizierten ETS-1-positiven primären Glioblastomen wurden für die weiteren Untersuchungen drei Tumore ausgewählt, von denen direkt postoperativ im Labor mesenchymale Zellen mit stammzellartigen Eigenschaften (gbMSLCs) isoliert werden konnten. In den HE-Färbungen zeigen die ausgewählten Glioblastome ein pleomorphes gliales Zellbild mit erhöhter Zelldichte, hyperchromatischen Kernen mit oftmals prominenten Nucleoli und zahlreichen Mitosen (Abb. 1). Es fanden sich flächige nekrotische Areale neben Strichnekrosen und Endothelproliferationen. Die intratumorösen Gefäße wiesen zum Teil ein girlandenförmiges Wachstumsmuster auf. Zudem fanden sich vereinzelt thrombosierte Gefäße. Somit erfüllen alle drei Tumore die konventionell-histopathologischen Diagnosekriterien für ein Glioblastom (Grad IV nach WHO-Klassifikation, Stand 2007 [163]). Die immunhistochemische Färbung für das in sekundären Glioblastomen charakteristischer Weise mutierte IDH-1-Protein fiel in den untersuchten Gewebeproben negativ aus (Abb.1). In der immunhistochemischen Färbung für ETS-1 zeigte sich in Gliomzellen sowie in intratumorösen Endothelzellen eine spezifische, perinukleär betonte Anfärbung (Abb.1, →* Abb.2). Hierzu ist anzumerken, dass durch das verwendete HOPE®-Fixierungsverfahren eine Kernpermeabilisierung nicht in gleicher Weise wie nach Paraffineinbettung möglich war. Dementsprechend ist keine eindeutige Kernfärbung zu erkennen.

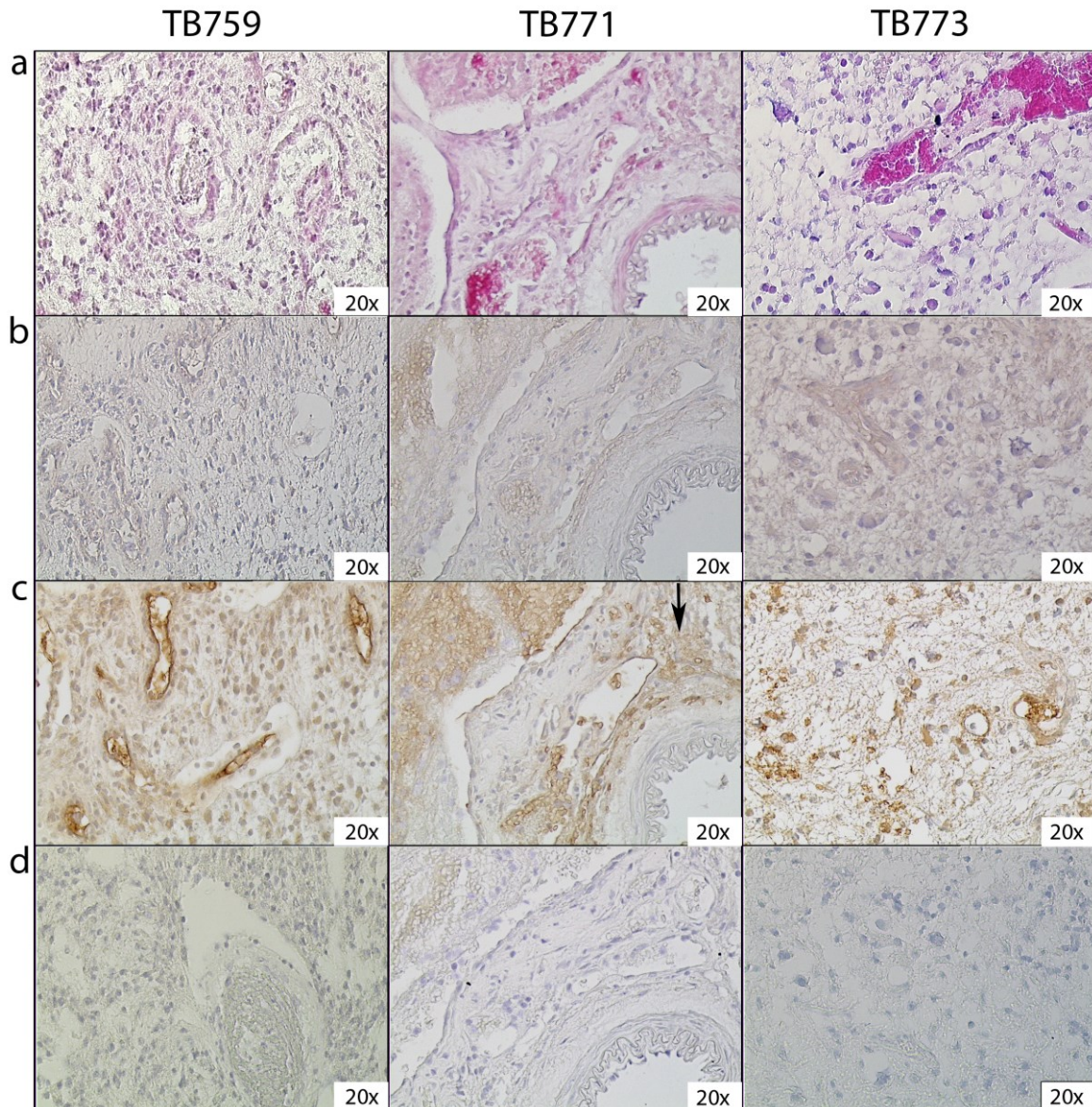
Zusätzlich wurden Elastika van Gieson (EVG)-Färbungen und Färbungen für den Endothelzellmarker CD31 durchgeführt, um die räumliche Korrelation der ETS-1-Expression mit intratumorösen Gefäßen zu untersuchen (Abb. 2).

In allen Tumoren konnte neben dem zuvor von Kitange et al. beschriebenen stromalen ETS-1-Signal auch die von Valter et al. beschriebene Kapillaranfärbung nachgewiesen werden (Abb. 1) [138, 140] .

In zellreichen Tumorarealen, in denen sich nur wenige CD31-positive Gefäße zeigten, fanden sich ebenfalls weniger ETS-1-positive Gliomzellen, während sich in zellreichen Tumorarealen, korrelierend mit einer erhöhten Kapillardichte, eine vermehrte Anzahl ETS-1-

positiver Gliomzellen nachweisen ließ (Abb. 2). In einzelnen Tumorarealen fanden sich auch größere Gefäßabschnitte, die ein verstärktes perivaskuläres ETS-1-Signal aufwiesen (→, Abb. 1).

Abb. 1: Identifikation ETS-1-positiver primärer Glioblastome



a: HE-Färbungen aller drei Glioblastome

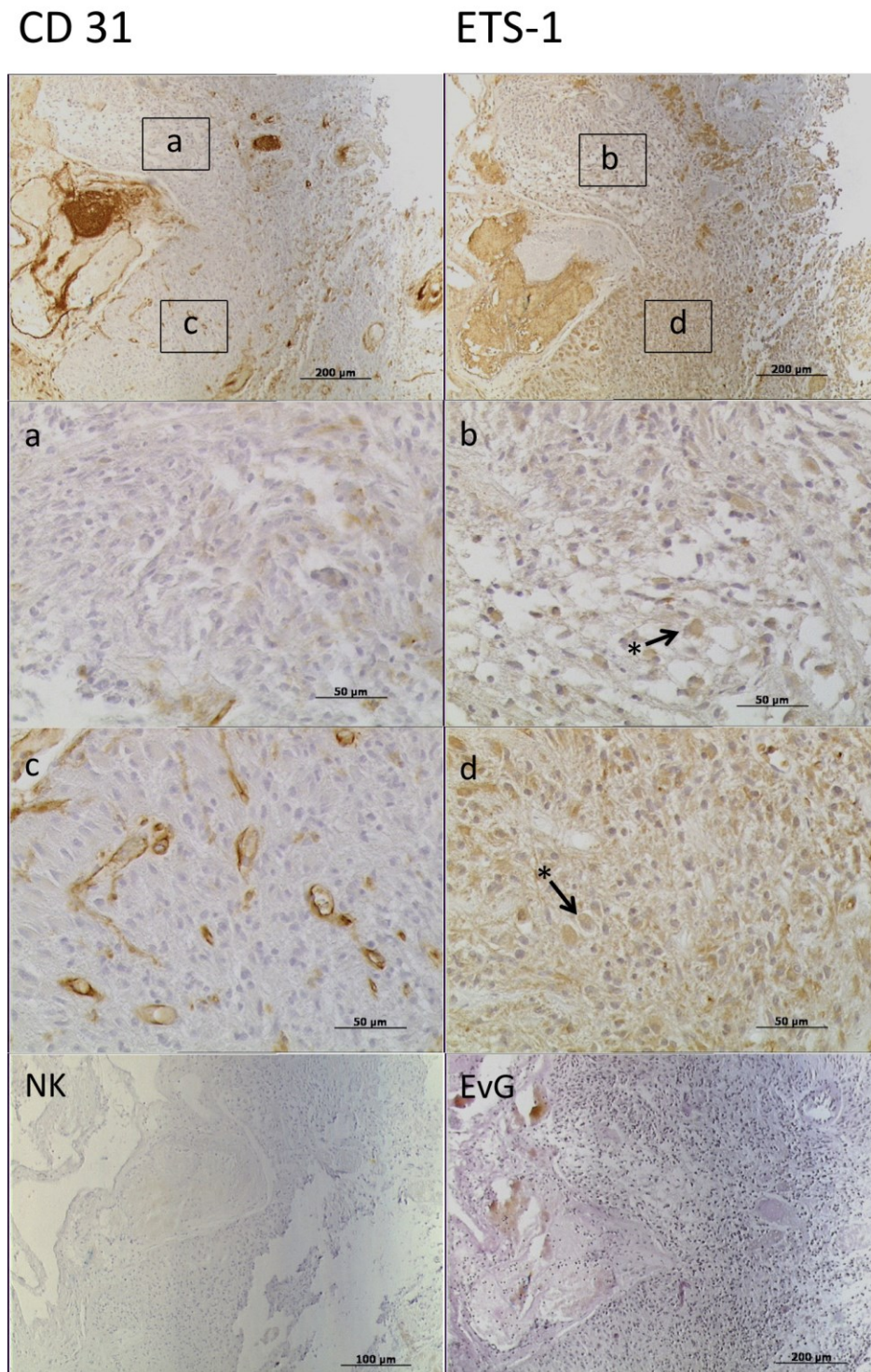
b: IDH-1-Mutation-Antikörperfärbung: keine spezifische Anfärbung in allen drei Tumoren

c: ETS-1-Antikörperfärbung: positives Signal intratumorös sowie in Endothelzellen der Tumorkapillaren

d: Negativkontrolle (NK)

→ Verstärktes perivaskuläres ETS-1-Signal im Bereich größerer Gefäße

Abb. 2 Korrelation der CD31-Expression mit der ETS-1-Expression, exemplarisch illustriert an Tumor TB771



Vergleich der ETS-1-Expression in Tumorarealen mit unterschiedlicher Kapillardichte
a,b: Verringerte ETS-1-Expression in Tumorarealen mit verminderter Kapillardichte
(Korrelation anhand CD31-Expression)

c,d: Deutlich vermehrte ETS-1-Expression in Tumorarealen mit erhöhter Kapillardichte
(Korrelation anhand CD31-Expression)

→* Perinukleäres Signal für ETS-1 in Tumorzellen

NK: Negativkontrolle

EvG: Elastika van Gieson Färbung zur Differenzierung arterieller und venöser Gefäße

In allen Tumoren konnte neben einem positiven Signal von Zellen im Tumorstroma die endotheliale Anfärbung von ETS-1 in Tumorkapillaren nachgewiesen werden (c, Abb. 1).

In dem untersuchten Glioblastom TB771 zeigte sich eine verstärkte Expression von ETS-1 in Arealen, die größeren Gefäßen benachbart sind, welche aufgrund ihrer regelrechten Wandstruktur am ehesten physiologischen Gefäßen entsprechen (→ Abb.1). Da in den vorliegenden Gewebeproben der Glioblastome TB759 und TB773 keine größeren Gefäße nachweisbar waren, konnte in diesen Tumoren keine entsprechende Korrelation vorgenommen werden.

5.1.2 Expression von ETS-1 in gbMSLC und Gliomzelllinien

Zur weiteren Beurteilung der jeweiligen ETS-1-Expression in verschiedenen Zellsubpopulationen wurden aus den ETS-1-positiven Tumoren gewonnene Zellen mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften (gbMSLCs) für ETS-1 gefärbt (Abb. 3, Protokoll zur Isolation und Charakterisierung der Zellen s. 4.2.2.1 und 4.2.2.3).

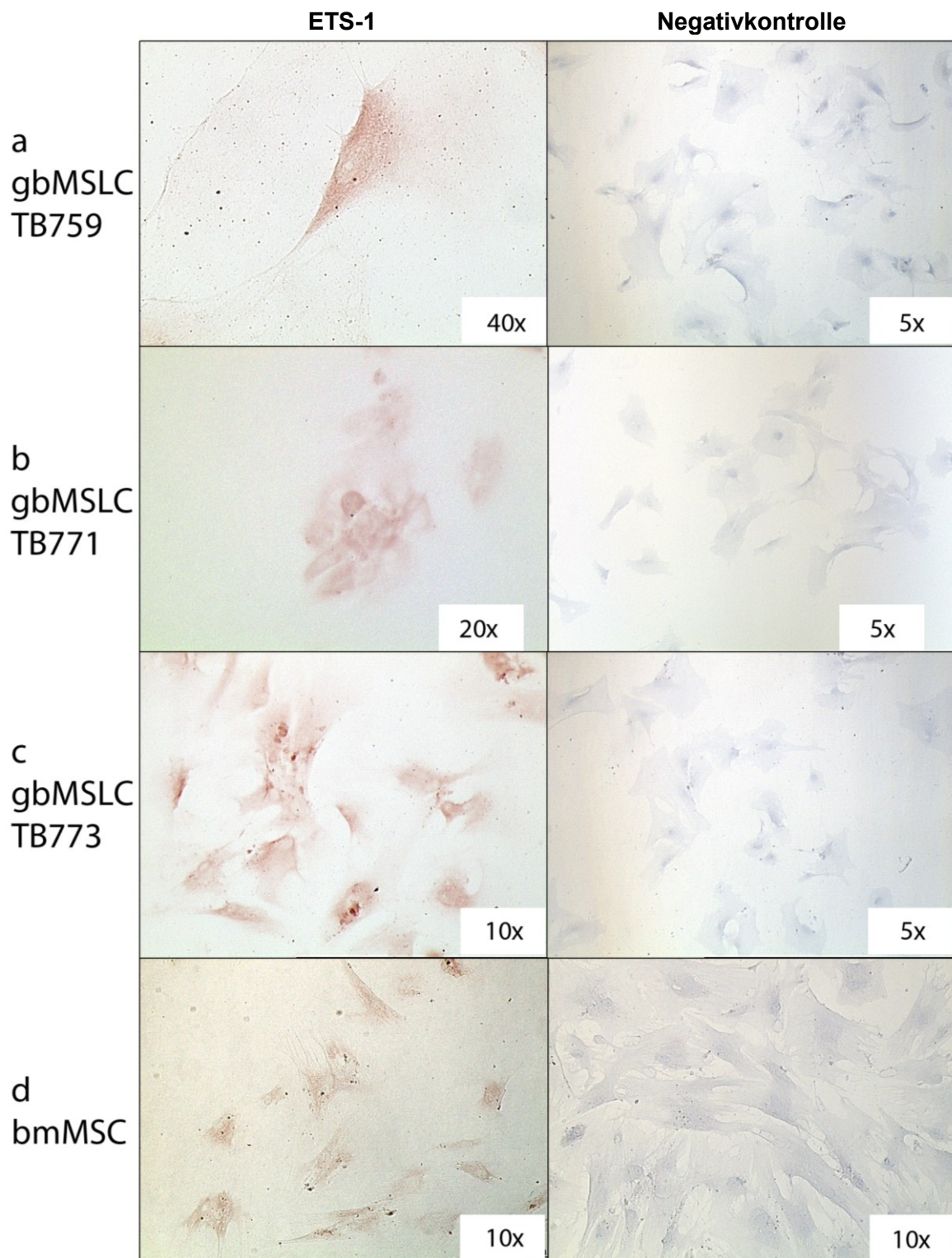
Zum Vergleich diente eine in unserem Labor isolierte mesenchymale Stammzelllinie eines Knochenmarkspenders (bmMSC BM20) sowie die kommerziell erhältlichen Glioblastomzelllinien U87, U251 und U373. Für U87 und U251 ist in der Literatur eine ETS-1-Expression beschrieben, so dass diese dementsprechend als Positivkontrolle fungierten [154].

In den immunzytochemischen Färbungen zeigte sich für ETS-1 eine kernbetonte Anfärbung der gbMSLCs mit nach peripher abnehmender Reaktivität des Zytoplasmas (Abb. 3, Zeile 1-3). Die zum Vergleich für die selbst isolierten gbMSLCs verwendeten bmMSC wiesen nukleär und zytoplasmatisch eine deutlich geringere Reaktivität auf (Abb.3, Zeile 4).

Sämtliche untersuchte, kommerziell erhältliche Gliomzelllinien zeigten ein stark positives nukleär und perinukleär betontes ETS-1-Signal (Abb. 4).

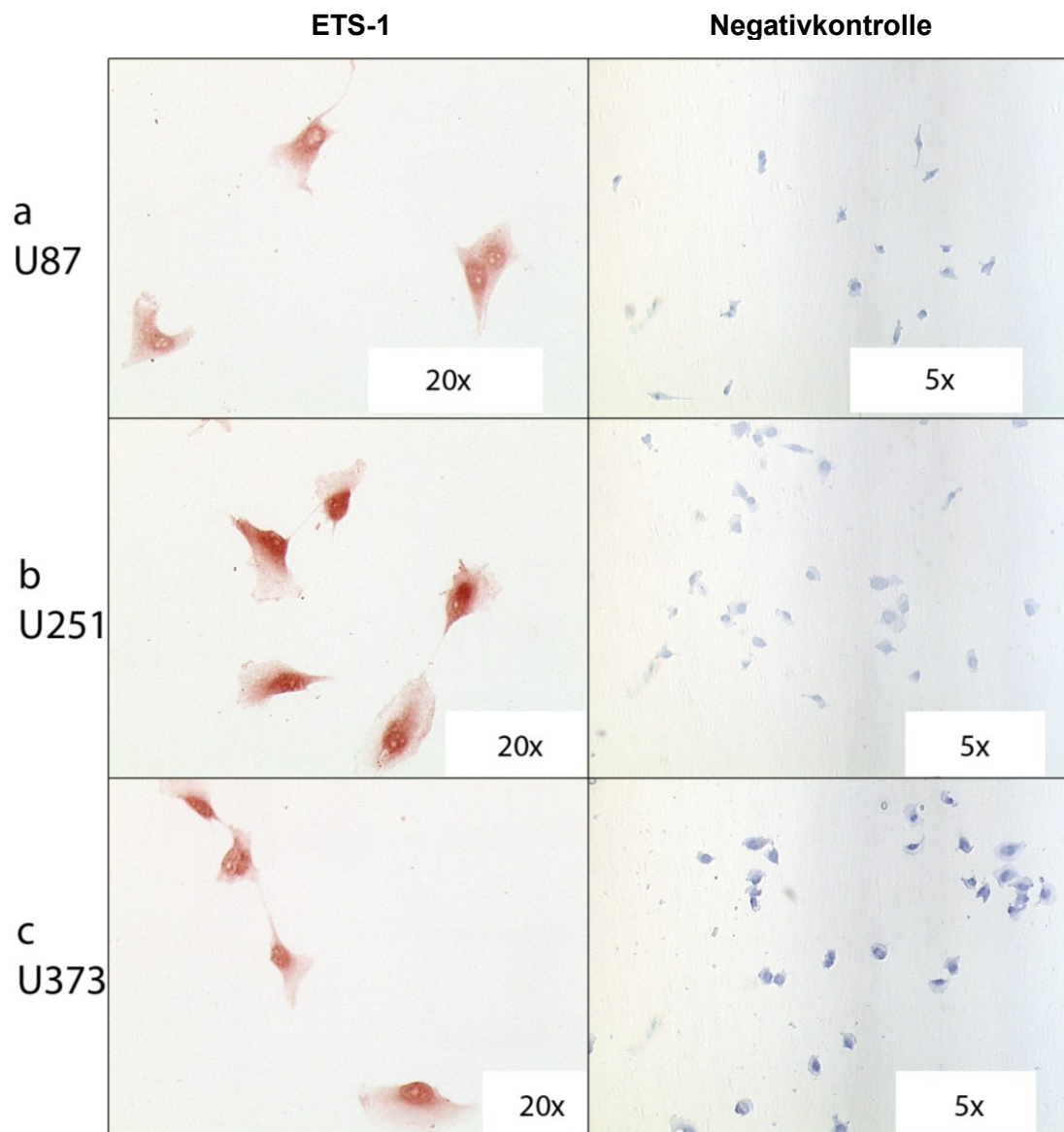
Eine immunhistochemische Färbung der ebenfalls untersuchten Tumorendothelzellen war nicht möglich, da diese nicht auf den für das Untersuchungsverfahren nötigen Objektträgern anwuchsen.

Abb. 3 Immunzytochemische Färbung der gbMSLCs für ETS-1



*Immunzytochemie für ETS-1 in den untersuchten gbMSLCs sowie der zum Vergleich dienenden Knochenmarkszelllinie bmMSC BM20 nach Kernpermeabilisierung mit NP40: spezifische nukleäre und perinukleäre Anfärbung gegen ETS-1 in gbMSLCs (a-c), deutlich geringere Anfärbung in bmMSCs (d)
Korrespondierend hierzu die parallel angefertigten Negativkontrollen*

Abb. 4 Immunzytochemische Färbung der kommerziell erhältlichen Gliomzelllinien für ETS-1



Immunzytochemie für ETS-1 in kommerziell erhältlichen Glioblastomzelllinien nach Kernperameabilisierung mit NP40: kräftige, spezifische nukleäre und perinukleäre Anfärbung (a-c)

Korrespondierend hierzu die parallel angefertigten Negativkontrollen

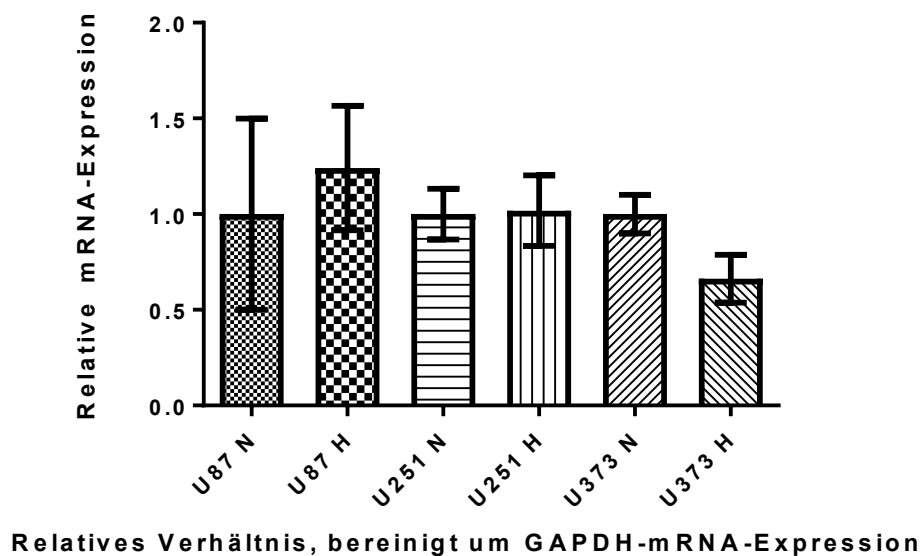
5.2 Hypoxieversuche

5.2.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-Expression in Glioblastomzellen

Da für ETS-1 in nicht glialen Tumoren eine hypoxieabhängige Expression beschrieben wird und auch in Glioblastomen ein hypoxisches Milieu herrscht, wurden RT-PCR-Untersuchungen an gbMSLCs sowie den Gliomzelllinien U87, U251 und U373 zur Bestimmung der ETS-1-mRNA-Expression unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Versuchsansätze wurden für jede Zelllinie jeweils drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Die PCR-Gele wurden abfotografiert und mittels ImageJ quantifiziert. Die Werte für ETS-1 unter Normoxie und Hypoxie wurden auf die jeweilige Expression des Housekeeping-Genes GAPDH bezogen. Berechnet wurden das Verhältnis der ETS-1-Expression unter hypoxischen Bedingungen zu der ETS-1-Expression unter normoxischen Bedingungen, der Standardfehler (SEM) sowie die Signifikanz (p) mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

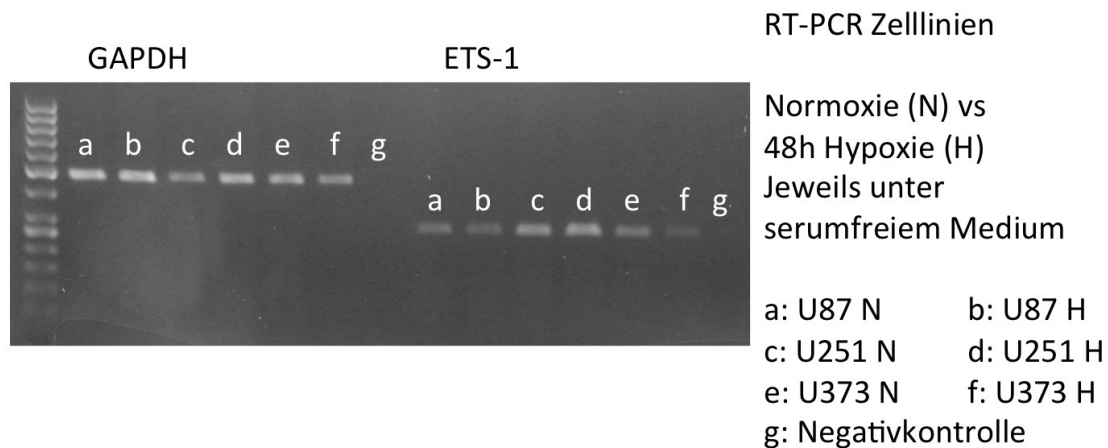
Abb. 5 Densitometrische Auswertung der ETS-1-mRNA-Expression in kommerziell erhältlichen Gliomzelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie

ETS-1-mRNA-Expression nach 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie



Relatives Verhältnis der ETS-1-mRNA-Expression in U87, U251 und U373 nach Exposition gegenüber 48h Normoxie (N) vs. 48h Hypoxie (H) unter serumfreiem Medium: kein eindeutiger Trend der ETS-1-mRNA-Regulation unter hypoxischen Bedingungen, p jeweils $\geq 0,2$, angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Abb. 6 RT-PCR ETS-1-mRNA Expression in kommerziell erhältlichen Gliomzelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie

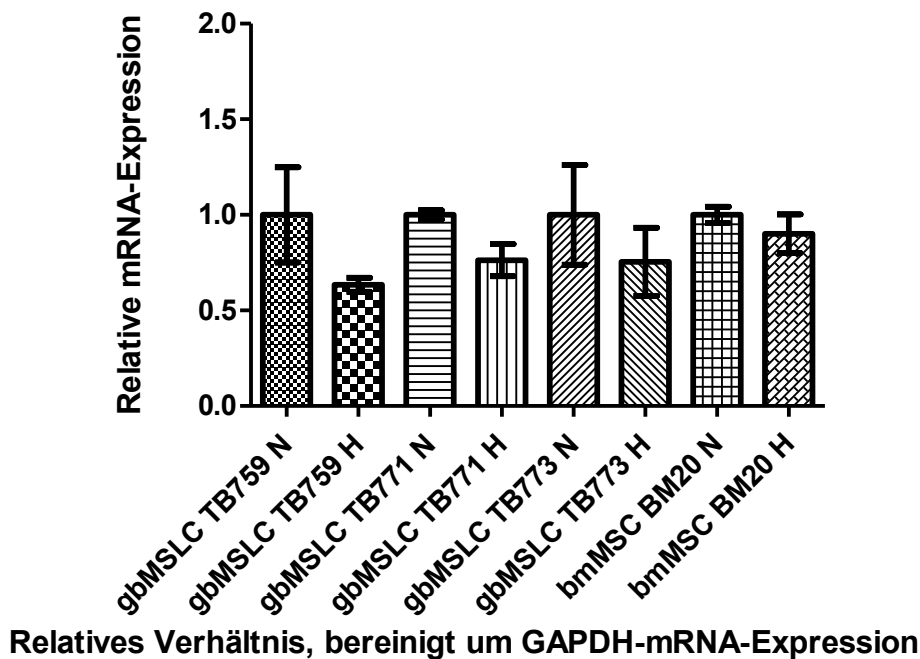


Exemplarische RT-PCR der Zelllinien U87 U251 und U373 nach Exposition gegenüber 48h Normoxie (N) vs. 48h Hypoxie (H) unter serumfreiem Medium

In keiner der kommerziell erhältlichen Tumorzelllinien ließ sich ein signifikanter Effekt der Hypoxie auf die ETS-1-mRNA-Expression nachweisen (p jeweils $\geq 0,2$). Während man in Zusammenschau aller unabhängig voneinander durchgeführten Versuche für U87 einen nicht signifikanten Anstieg beobachten konnte, zeigte sich für U251 ein ausgeglichenes Verhältnis und für U373 eine relative, nicht signifikante Abnahme der ETS-1-mRNA-Expression unter Hypoxie (Abb. 5, 6).

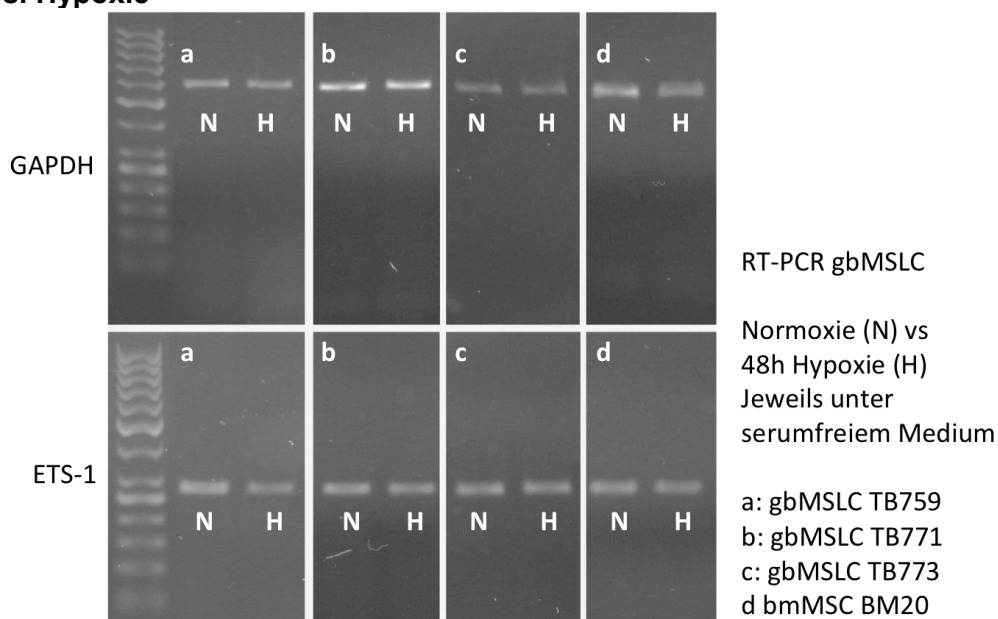
Abb. 7 Densitometrische Auswertung der ETS-1-mRNA Expression gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie

ETS-1-mRNA-Expression nach 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie



Relatives Verhältnis der ETS-1-mRNA-Expression in den untersuchten gbMSLC-Zelllinien sowie der untersuchten bmMSC-Zelllinie nach Exposition gegenüber 48h Normoxie (N) vs. 48h Hypoxie (H) unter serumfreiem Medium: in allen Zelllinien nicht signifikanter Abfall unter hypoxischen Bedingungen, p jeweils $\geq 0,1$, angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Abb. 8 RT-PCR der ETS-1-mRNA-Expression in gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie



Exemplarische RT-PCR aller MSCLC sowie bmMSC nach Exposition gegenüber 48h Normoxie (N) vs. 48h Hypoxie (H) unter serumfreiem Medium

In den analog untersuchten gbMSLCs zeigte sich in sämtlichen Zelllinien unter Berücksichtigung aller drei Experimente und nach Normalisierung der Werte bezogen auf die

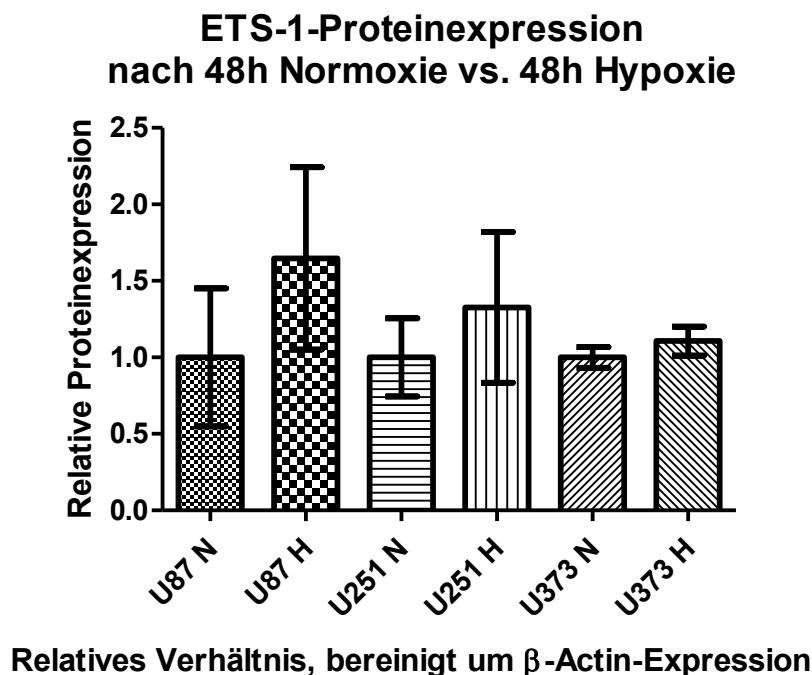
GAPDH-Expression eine, wenn auch nicht signifikante Abnahme der ETS-1-mRNA-Expression unter Hypoxie (p jeweils $\geq 0,1$) (Abb. 7, 8).

Für bmMSCs, welche als Kontrolle verwendet wurden, waren für die Erzielung sichtbarer Banden in der ETS-1-RT-PCR im Vergleich zu gbMSLCs bei gleicher cDNA-Menge 2 Zyklen mehr nötig um sichtbare Banden zu erzielen. Dies bestätigte die Ergebnisse der unserer immunzytochemischen Färbungen, welche diese Minderexpression bereits angedeutet hatten (Vgl. Absatz 5.1.2).

Zusätzlich bestimmten wir die ETS-1-Proteinexpression mittels Western Blot. In den kommerziell erhältlichen Tumorzelllinien war bezogen auf das House Keeping Gene β -Actin ein tendentieller, nicht signifikanter Anstieg der ETS-1-Protein-Expression unter Hypoxie feststellbar (p jeweils $\geq 0,4$) (Abb. 9, 10).

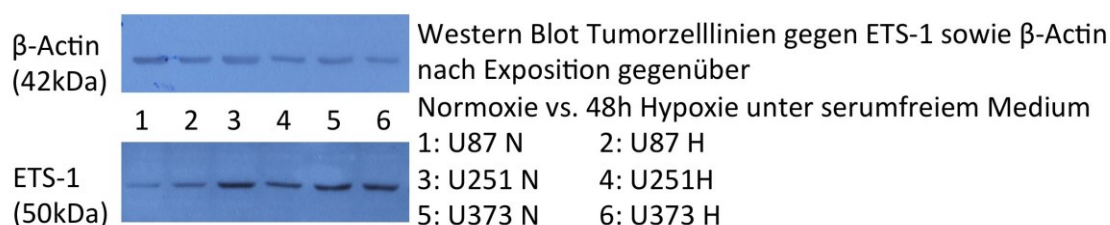
Auch die gbMSLCs wiesen keine signifikante Änderung der ETS-1-Protein-Expression unter Hypoxie auf. Während sich in der Zelllinie gbMSLC TB759 ein tendentieller Anstieg der ETS-1-Protein-Expression beobachten ließ ($p=0,1$), zeigten die anderen untersuchten gbMSLC-Zelllinien sowie die bmMSC-Zelllinie keine signifikante Änderung der ETS-1-Protein-Expression unter Hypoxie (jeweils $p=1$). Die absolute ETS-1-Protein-Expression der aus Glioblastomen isolierten gbMSLC-Zelllinien war deutlich höher als die ETS-1-Expression der als Vergleich genutzten bmMSC-Zelllinie (Abb.11, 12).

Abb. 9 Densitometrische Auswertung ETS-1-Expression Western Blot kommerzielle Zelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie



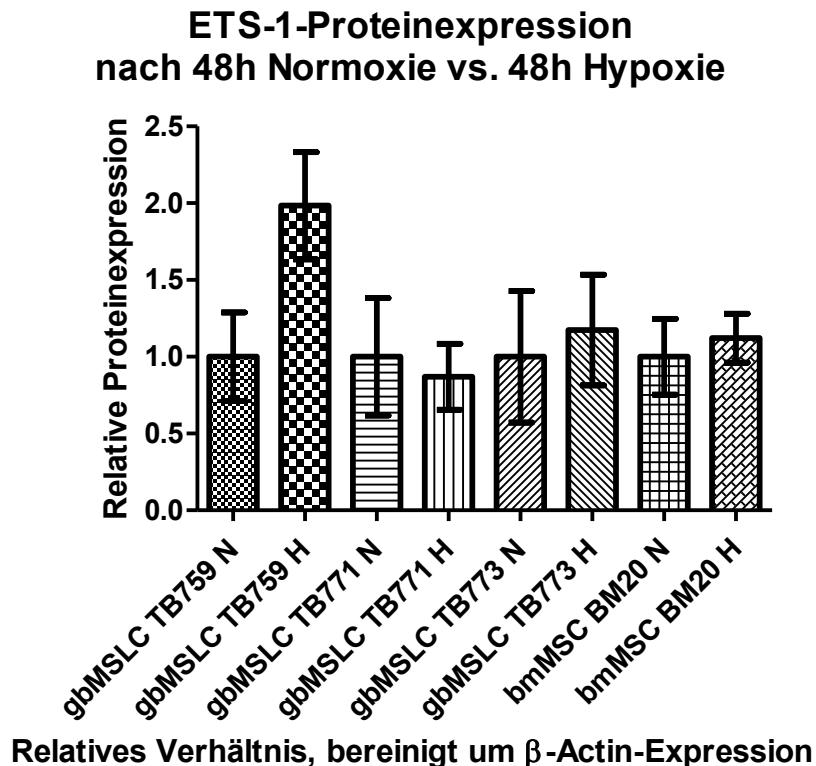
Relatives Verhältnis der ETS-1-Protein-Expression in U87, U251 und U373 nach jeweils 48h Normoxie (N) vs. 48h Hypoxie (H) unter serumfreiem Medium: keine signifikante Änderung der Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen, p jeweils $\geq 0,4$, angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Abb. 10 Western Blot ETS-1-Expression kommerzielle Gliomzelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie



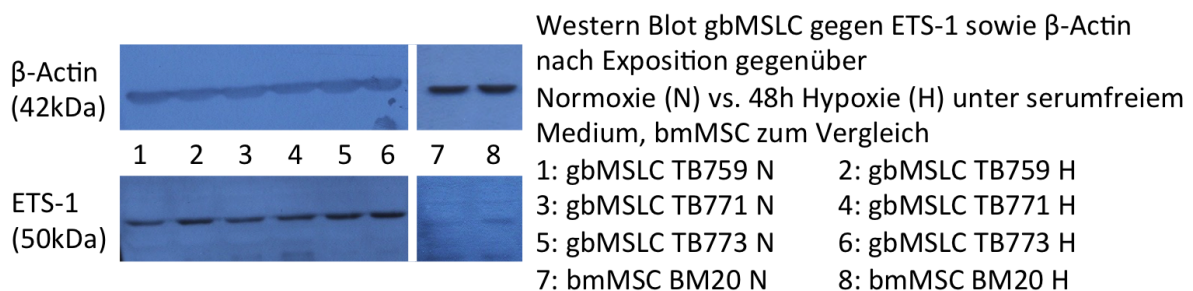
Exemplarische Western Blots der kommerziell erhältlichen Tumorzelllinien U87, U251 und U373 gegen β -Actin und ETS-1 nach Inkubation unter 48h Normoxie (N) vs. 48h Hypoxie (H) unter serumfreiem Medium

Abb. 11 Densitometrische Auswertung ETS-1-Expression Western Blot gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie



Relatives Verhältnis der ETS-1-Protein-Expression in den untersuchten gbMSLC-Zelllinien sowie der untersuchten bmMSC-Zelllinie nach jeweils 48h Normoxie/Hypoxie unter serumfreiem Medium: Keine signifikante Änderung der Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen, p jeweils $\geq 0,1$, angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Abb. 12 Western Blot ETS-1-Expression gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie



Exemplarische Western Blots der aus Glioblastomen isolierten gbMSLCs sowie der als Vergleich genutzten bmMSC-Zelllinie gegen β -Actin und ETS-1 nach Inkubation unter 48h Normoxie (N, 21% O_2) vs. 48h Hypoxie (H, 0,1% O_2) unter serumfreiem Medium

5.2.2 Der Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-Expression in Glioblastomendothelzellen

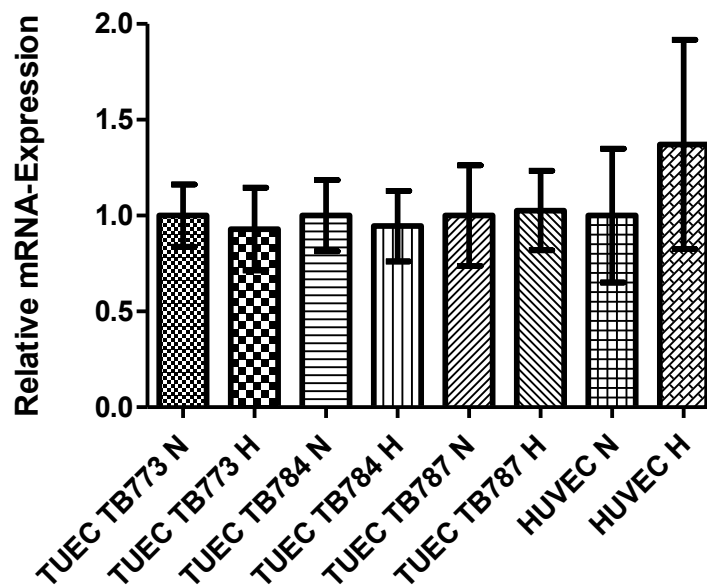
Da sich in den immunhistochemischen Färbungen ein positives Signal des Endothels der Tumorkapillaren als auch eine erhöhte ETS-1-Expression von Zellen in Bereichen des Tumorgewebes mit erhöhter Gefäßdichte gezeigt hatte, wurde ergänzend noch die ETS-1-

Expression von isolierten Tumorendothelzellen untersucht. Zur Detektion einer etwaigen Hypoxieabhängigkeit wurden zunächst RT-PCR und konsekutiv Western Blot Untersuchungen durchgeführt. Als Kontrolle wurden HUVEC, eine kommerziell erhältliche Zelllinie aus Nabelschnur gewonnener Endothelzellen, verwendet. Weder für die aus dem Tumor isolierten Endothelzellen noch die Kontrollzelllinie HUVEC ließ sich eine signifikante Änderung der ETS-1-mRNA-Expression unter serum- und wachstumsfaktorfreiem Medium nachweisen (p jeweils $\geq 0,7$) (Abb. 13, 14).

Auch auf Proteinebene war für alle untersuchten Endothelzellen keine signifikante Änderung der ETS-1-Expression unter hypoxischen Bedingungen unter serum- und wachstumsfaktorfreiem Medium feststellbar (p jeweils $\geq 0,7$) (Abb15, 16).

Abb. 13 Densitometrische Auswertung ETS-1-mRNA Expression Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie

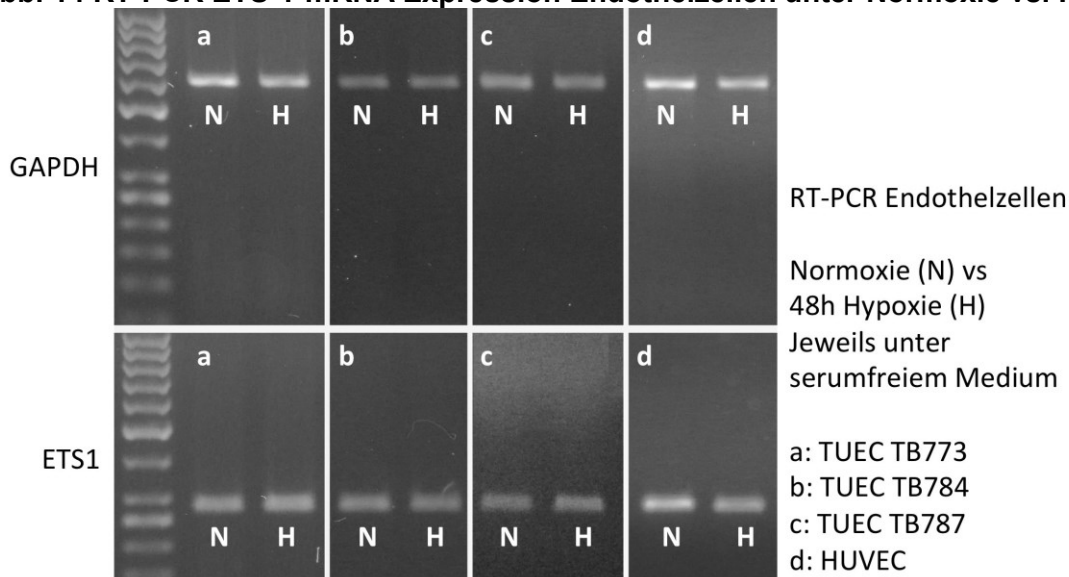
ETS-1-mRNA-Expression nach 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie



Relatives Verhältnis um GAPDH-mRNA-Expression bereinigt

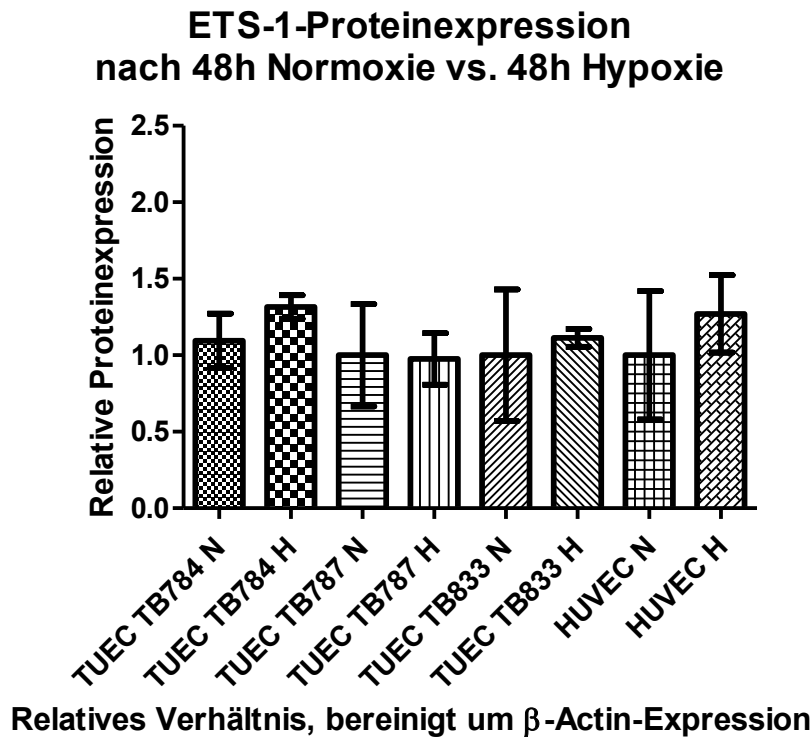
Relatives Verhältnis der ETS-1-mRNA-Expression in den untersuchten Tumorendothel-Zelllinien sowie der Kontroll-Zelllinie HUVEC nach jeweils 48h Normoxie (N) vs. Hypoxie (H) unter serum- und wachstumsfaktorfreiem Medium: keine signifikante Änderung der ETS-1-mRNA-Expression unter hypoxischen Bedingungen (p jeweils $\geq 0,7$), angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Abb. 14 RT-PCR ETS-1-mRNA Expression Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie



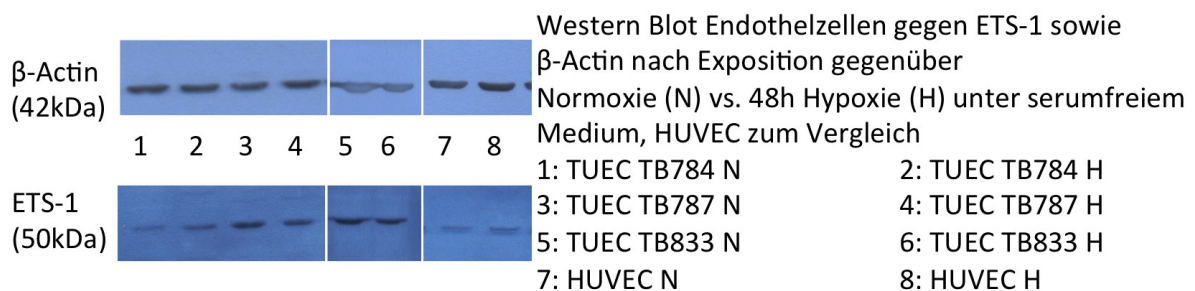
Exemplarische RT-PCR der untersuchten Tumorendothelzellen sowie von HUVEC nach Inkubation unter 48h Normoxie (N) vs. 48h Hypoxie (H) unter serum- und wachstumsfaktorfreiem Medium

Abb. 15 Densitometrische Auswertung ETS-1-Expression Western Blot Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie



Relatives Verhältnis der ETS-1-Protein-Expression in den untersuchten Tumorendothel-Zelllinien sowie der Kontroll-Zelllinie HUVEC nach jeweils 48h Normoxie (N) vs. Hypoxie (H) unter serum- und wachstumsfaktorfreiem Medium: keine signifikante Änderung der ETS-1-Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen (jeweils $p \geq 0,4$), angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Abb. 16 Western Blot ETS-1-Expression Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie



Exemplarische Western Blots der aus Glioblastomen isolierten Tumorendothelzellen sowie der als Vergleich genutzten HUVEC gegen β -Actin und ETS-1 nach Exposition gegenüber Normoxie (N) vs. 48H Hypoxie (H) unter serum- und wachstumsfaktorfreiem Medium

6 Diskussion

6.1 Expression und lokale Verteilung von ETS-1 in Glioblastomen

Die Expression des Transkriptionsfaktors ETS-1 korreliert in vielen Tumoren wie dem Mammakarzinom oder dem Pankreaskarzinom mit dem Malignitätsgrad und stellt oftmals einen unabhängigen ungünstigen Prognosefaktor dar [88]. Eine ETS-1-Expression in Tumoren wurde von der Arbeitsgruppe von Wernert et al. insbesondere in neoplastischen Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten beschrieben, welche die wesentlichen Zellen des Tumormikromilieus darstellen [137]. Kitange et al. konnten auch für astrozytäre Tumore eine Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad und der ETS-1-Expression zeigen [138]. In ihrer Analyse stellten sie fest, dass in etwa 65 % der primären Glioblastome eine ETS-1 Expression nachzuweisen ist. Sie beschrieben eine homogene Anfärbung des Tumorgewebes, wobei der Anteil ETS-1-positiver Zellen interindividuell zwischen 10 und 90% schwankte. Valter et. al hingegen beschrieben eine ETS-1-Expression in Glioblastomen vor allem in Endothelzellen von Kapillaren, wobei sie ihre Hypothese, dass ETS-1 die intratumoröse Neoangiogenese aktiv beeinflusst beziehungsweise reguliert, durch die Korrelation mit der CD34-Expression belegen konnten [140]. Sie beschrieben zudem in aktivierten epitheloiden Endothelzellen eine kernbetonte Anfärbung gegen ETS-1, während sie in flachen inaktiven Endothelzellen eine zytosolische Anfärbung beobachteten [140]. Sonstige Arbeiten hinsichtlich der lokalen ETS-1-Expression in Glioblastomen sind bislang nicht bekannt. Aufgrund der in den Vorgängerarbeiten differierenden und somit inkongruenten Beschreibungen der ETS-1-Expression in Glioblastomen, war das erste Ziel dieser Arbeit ETS-1-positive primäre Glioblastome zu identifizieren, um in einem weiteren Schritt die lokale Distribution ETS-1-positiver Zellen innerhalb der Tumore zu untersuchen. Da die Versuche für diese Arbeit bereits vor Erscheinen der aktuellen WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2016 erfolgten, wurden für die Diagnosestellung noch die Kriterien der WHO-Klassifikation von 2007 zugrunde gelegt [163]. Aufgrund der schon verfügbaren Literatur erfolgte jedoch auch eine immunhistochemische Bestimmung hinsichtlich einer etwaigen Mutation IDH-1-Rezeptors, welcher seit der Aktualisierung der WHO-Klassifikation 2016 maßgeblich zur Unterscheidung primärer und sekundärer Glioblastome herangezogen wird [4].

Während sich in zwei von drei Tumoren jeweils eine homogene Expression von CD31 und ETS-1 beobachten ließ, zeigte sich einem der untersuchten Tumore eine deutlich erhöhte ETS-1-Expression in Bereichen mit vermehrter Tumorkapillardichte (Korrelation anhand des Endothelzellmarkers CD31). Angrenzende gefäßärmere Tumorabschnitte wiesen eine geringere ETS-1-Expression in den umliegenden Glioblastomzellen auf.

Eine Korrelation der ETS-1-Expression mit der intratumorösen Kapillardichte ist bereits für andere Tumorentitäten beschrieben [96]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die ETS-1-Expression von Tumorzellen in primären Glioblastomen räumlich mit der intratumorösen Kapillardichte korreliert.

Zudem konnten wir im Bereich größerer Gefäße perivaskulär eine vermehrte ETS-1-Expression im Tumorstroma nachweisen. Generell wird in der perivaskulären Nische das Vorkommen von Tumorstammzellen beschrieben [164]. Die räumliche Korrelation legt die Vermutung nahe, dass ETS-1 nicht nur von Tumorendothelzellen, sondern auch von Tumorzellen mit stammzellartigen Eigenschaften exprimiert wird. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen haben wir eine Zellsubtypenanalyse hinsichtlich der ETS-1-Expression in Glioblastomzellen durchgeführt.

Da sich in zwei der untersuchten Tumoren eine homogene Reaktivität sowohl für CD31 als auch für ETS-1 zeigte, sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Beschreibungen von Kitange et al. vereinbar [138]. Kitange et al. nahmen in ihrer Arbeit keine Korrelation der ETS-1-Expression mit der Tumorkapillardichte vor. Eine unterschiedliche Tumorkapillarnetzsdichte könnte die von Kitange et al. beschriebene Varianz des Anteils der ETS-1-exprimierenden Zellen von 10-90% in den untersuchten Glioblastomen erklären. Eine unterschiedliche ETS-1-Expression in verschiedenen Anteilen eines Glioblastoms, wie sie in dieser Arbeit beispielhaft gezeigt werden konnte, ist auch aufgrund der generellen histopathologischen Heterogenität von Glioblastomen gut zu erklären.

Die Beobachtung, dass die ETS-1-Expression mit der CD31-Expression korreliert, passt auch zu den Ergebnissen von Valter et. al., der eine ETS-1-Expression insbesondere im Bereichen aktiver Neoangiogenese beschrieb [140]. In unseren Färbungen konnte jedoch im Gegensatz zu der Arbeit von Valter et al. auch die Anfärbbarkeit stromaler Zellen in Glioblastomschnitten gezeigt werden, wie auch von Kitange et al. beschrieben [138].

Beim Vergleich der Ergebnisse von Kitange et al., Valter et al. und dieser Arbeit ist zu berücksichtigen, dass allen drei Arbeiten eine deskriptive Analyse weniger exemplarischer Fälle zugrunde liegt. Somit ist es durchaus denkbar, dass die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeiten schlicht der histopathologischen Heterogenität von Glioblastomen geschuldet sind.

Zur weiteren Charakterisierung der ETS-1-Expression in aus den ETS-1-positiven gewonnenen Tumoren gewonnenen Zellen führten wir ergänzende immunhistochemische Untersuchungen durch.

6.2 ETS-1-Expression in gbMSLC und Gliomzelllinien

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, inwieweit in unserem Labor identifizierte und isolierte mesenchymale Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften (gbMSLCs) ETS-1 exprimieren, sowie das intrazelluläre Verteilungsmuster zu bestimmen. Als Kontrollen

wurden unter anderem die erwähnten kommerziell erhältlichen Tumorzelllinien verwendet, für die in der Literatur eine ETS-1-Expression beschrieben ist [128, 153].

In den immunzytochemischen Färbungen konnten wir sowohl in den kommerziell erhältlichen Tumorzelllinien als auch in den gbMSLCs eine spezifische nukleäre und perinukleäre Expression nachweisen, was zu der in der Literatur beschriebenen Expressionsverteilung in Gliomzellen passt [138]. Ein weiteres neues Ergebnis dieser Arbeit ist somit, dass in ETS-1-positiven primären Glioblastomen Zellen mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften vorkommen, die ETS-1 nukleär sowie im perinukleären Zytoplasma exprimieren.

Im Vergleich zu den untersuchten gbMSLC-Zelllinien zeigte sich eine verminderte Reaktivität der aus Knochenmark eines gesunden Spenders gewonnenen bmMSC-Zelllinie in der ETS-1 Antikörperfärbung. Diese Beobachtung bestätigte sich in weiterführenden Untersuchungen mittels RT-PCR und Western Blot.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die generelle ETS-1-Expression in Glioblastomzellen mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften höher ist als in mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark gesunder Menschen. Da in der Literatur eine Korrelation der ETS-1-Expression mit der Malignität astrozytärer Tumore beschrieben ist, liegt der Verdacht nahe, dass die erhöhte ETS-1-Expression ein charakteristisches Merkmal von Glioblastomzellen mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften ist [138]. Um diese Hypothese abschließend zu belegen, müsste jedoch in weiterführenden Untersuchungen die ETS-1-Expression von mesenchymalen Knochenmarksstammzellen und Glioblastomzellen mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften von demselben Patienten verglichen werden.

6.3 Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-Expression im Glioblastom

In der Literatur wird für verschiedene, nicht gliale Tumorzelllinien sowie die humane Endothelzelllinie HUVEC eine Hypoxieabhängigkeit der ETS-1-Expression beschrieben [105, 106]. Glioblastome sind äußerst rasch wachsende Tumore mit Ausbildung intratumoraler Nekrosen und einem damit einhergehenden hypoxischen Milieu [165].

Um zu überprüfen, ob sich eine Induktion von ETS-1 durch Hypoxie auch in Glioblastomen zeigen lässt, lag das nächste, wesentliche Augenmerk dieser Arbeit daher darauf, die Hypoxieabhängigkeit der ETS-1 Expression in verschiedenen Glioblastomzellen zu untersuchen.

Aufgrund der in der Literatur bereits beschriebenen Induktion der ETS-1-Expression in Gliomzellen durch FCS erfolgte die 48h-Inkubation unter Normoxie und Hypoxie in serumfreiem Medium [153]. Zur Validierung unserer Untersuchungen führten wir diese parallel mit kommerziell erworbenen Glioblastomzelllinien durch, für die in der Literatur bereits eine ETS-1 Expression beschrieben ist, hatten [128, 166, 167]. Diese hatten wir ebenfalls durch immunzytochemische Färbungen bestätigt (s.o.).

Da ETS-1 neben VEGF nachgewiesener Maßen eine wichtige Rolle in der Angiogenese verschiedener Karzinome spielt und wir in unseren immunhistochemischen Färbungen die vorbeschriebene Expression in Gliomendothelzellen bestätigen konnten, wollten wir auch untersuchen, inwiefern in aus Glioblastomen isolierten Endothelzellen eine Hypoxieabhängigkeit der ETS-1-Expression vorliegt [135, 137, 140, 143, 144]. Hierbei bestand insbesondere die Fragestellung, inwieweit Unterschiede zur Endothelzelllinie HUVEC, für die durch Oikawa et al. eine hypoxieabhängige ETS-1-Expression beschrieben ist, existieren [106]. Da Iwasaka et al. für mehrere Endothelzelllinien beschrieben hatten, dass verschiedene angiogene Wachstumsfaktoren wie aFGF, bFGF, VEGF, und EGF eine ETS-1-Expression induzieren, wurde für die Inkubation unter 48h Normoxie gegen 48h Hypoxie serum- und wachstumsfaktorfreies Endothelzellgrundmedium verwendet [166].

6.3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von ETS-1 in Glioblastomzellen

In der densitometrischen Auswertung der RT-PCR der kommerziell erhältlichen Zelllinien ließ sich kein eindeutiger Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-mRNA-Expression feststellen. In den untersuchten gbMSLCs sowie bmMSCs zeigte sich ein, wenn auch nicht signifikanter Abfall der ETS-1-mRNA-Expression unter Hypoxie. Auch in den untersuchten Tumorendothelzelllinien zeigte sich kein eindeutiger Einfluss von Hypoxie auf die ETS-1-mRNA-Expression. Gleiches galt für die als Kontrolle verwendete Zelllinie HUVEC.

Diese Ergebnisse bestätigten sich auch auf Proteinebene. In den kommerziell erhältlichen Zelllinien, zwei gbMSLC-Zelllinien sowie bmMSC zeigte sich ein tendentieller, nicht signifikanter Anstieg der ETS-1-Proteinexpression, während in einer gbMSLC-Zelllinie ein nicht signifikanter Abfall der ETS-1-Expression zu verzeichnen war. Auch die untersuchten Tumorendothelzellen sowie HUVEC wiesen keinen eindeutigen Trend auf. Diese Ergebnisse stehen auf den ersten Blick in Widerspruch mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppen von Oikawa et al. und Mamori et al., die einen Anstieg der ETS-1-Expression unter Hypoxie für die Urothelkarzinomzelllinie T24, HUVEC und die HCC-Zelllinie FLC-7 beschrieben hatten [105, 106]. Oikawa et al., die für die Urothelkarzinomzelllinie T24 eine durch Hypoxie induzierte HIF-1-medierte Steigerung der ETS-1-Expression gezeigt hatten und einen vergleichbaren Effekt für HUVEC beschrieben, hatten ihre Hypoxieversuche jedoch unter FCS- und im Falle von HUVEC auch wachstumsfaktorhaltigem Medium durchgeführt [106]. Für FCS und verschiedene Wachstumsfaktoren, die in Zusätzen für Endothelzellmedien enthalten sind existieren Beschreibungen, dass diese selbst zu einer vermehrten ETS-1-Expression führen [153, 166]. In der Arbeit von Mamori et al., der eine Steigerung der ETS-1-Expression unter Hypoxie für eine HCC-Zelllinie beschreibt, finden sich keine Angaben zum verwendeten Nährmedium, so dass hier ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich ist [105]. Somit ist es durchaus denkbar, dass ein Confounding von Hypoxie und

FCS-Bestandteilen möglich ist, was die Divergenz der Ergebnisse dieser Arbeit zu den Ergebnissen dieser beiden Arbeitsgruppen erklären kann.

Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit stehen auch die Daten von Qiao et. al., die in murinen Pankreaszelllinien zeigen konnten, dass Hypoxie zwar die ETS-1-mRNA-Expression passager steigert, die ETS-1-Proteinexpression jedoch sinkt oder unverändert bleibt, da ETS-1 unter schwerer Hypoxie ($O_2 < 10\%$) in Pankreaszellen vermehrt ubiquityniert und konsequent degradiert wird [107]. Da eine Hypoxieabhängigkeit der ETS-1-Expression bisher nur an nicht glialen Tumoren untersucht wurde ist durchaus denkbar, dass gliale Tumore ebenfalls eine andere ETS-1-Regulation unter Hypoxie als z.B. Karzinome aufweisen.

6.3.2 Dauer der Hypoxie-Exposition

Die Induktion von ETS-1 durch Hypoxie ist zeitabhängig. Oikawa et. al. beschreiben einen Anstieg der ETS-1-Expression in T24-Zellen nach drei Stunden, während sie hinsichtlich der ebenfalls beschriebenen HUVEC keine entsprechenden Angaben machen [106]. Die Versuchsdauer von Mamori et al. bei der Überprüfung der ETS-1-Abhängigkeit der HCC-Zelllinie FLC-7 betrug 96 Stunden [105]. Qiao et al. konnten zeigen, dass in murinen Pankreaszellen die ETS-1-mRNA-Expression unter Hypoxie innerhalb einer Stunde ansteigt, sich jedoch auch von 24 Stunden wieder normalisiert [107].

Da in Glioblastomen ein kontinuierlich hypoxisches Milieu herrscht, wählten wir als Beobachtungsintervall 48 Stunden, um kurzfristige, die *in vivo* Situation nicht wiedergebende, Effekte zu vermeiden. Anhand unserer Ergebnisse kann daher keine abschließende Aussage gemacht werden, ob es in Glioblastomzellen nicht eventuell doch als Reaktion auf eine neu aufgetretene Hypoxie zu einer kurzfristigen, passageren Erhöhung der ETS-1-Expression kommt, die jedoch die immunhistochemisch nachgewiesene ETS-1-Expression in den untersuchten Glioblastomen nicht ausreichend erklären würde.

Insgesamt ließ sich in den Versuchen für diese Arbeit keine Hypoxieabhängigkeit der ETS-1-Expression in Glioblastomen zeigen. Die bisherigen Ergebnisse lassen jedoch keinen endgültigen Schluss zu, ob unter Umständen nicht doch eine Koaktivierung der ETS-1-Expression durch bestimmte, im Körper zirkulierende Transkriptionsfaktoren und lokaler Hypoxie erfolgt. So ist eine Stimulation der ETS-1-Expression durch FCS und bFGF für Gliomzelllinien beschrieben [153]. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

6.4 Ausblick

ETS-1 ist ein Protoonkogen, welches in verschiedenen Gliomzelllinien die Migration und Proliferation begünstigt [128, 160]. Für die Glioblastomzelllinie U87 konnte auch gezeigt werden, dass ETS-1 essentiell für die Tumorbildung in CD1-Nacktmäusen ist [167]. Die Regulation und Funktion der ETS-1-Expression in gbMSLCs, welche in dieser Arbeit

erstmalig nachgewiesen wurde, bedarf jedoch weiterer Charakterisierung. Dies gilt insbesondere hinsichtlich der Frage, welchen Einfluss die ETS-1-Expression auf die Proliferation und Migrationsfähigkeit hat. Hierbei wäre vor allem ein Vergleich mit aus dem Knochenmark der jeweiligen Patienten gewonnenen bmMSCs interessant. Somit könnte der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei den isolierten gbMSCs um aus dem Knochenmark in den Tumor eingewanderte Zellen, die die Blut-/Hirnschranke überwunden haben, oder einen eigenständigen Zellsubtyp handelt.

ETS-1 wird im Gehirn physiologisch nicht exprimiert. Die Malignität des Glioblastoms liegt insbesondere in dem diffusen Migrationsverhalten der Glioblastomzellen und den daraus entstehenden therapeutischen Limitationen [11]. Somit sind weitere Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von ETS-1 auf die Funktion von gbMSCs vielversprechend, da es einen möglichen Ansatzpunkt zielgerichteter Therapien gegen Zellen darstellt, die möglicherweise durch ihre protumorigenen Eigenschaften zur Resistenz von Glioblastomen gegen Radio- und Chemotherapie beitragen.

7 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der bösartigste hirneigene Tumor. Ein wesentliches Merkmal von Glioblastomen ist die ausgedehnte diffuse Infiltration des Hirngewebes. Diese macht nicht nur eine komplette chirurgische Resektion unmöglich, sondern erschwert auch die adjuvante Radio-Chemotherapie.

Die Invasivität von Gliomzellen wurde in früheren Arbeiten mit der Expression des Proto-Onkoproteins ETS-1 in Verbindung gebracht. In verschiedenen nicht glialen Tumorzelllinien konnte bereits gezeigt werden, dass die ETS-1 Expression unter hypoxischen Bedingungen gesteigert ist. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in astrozytären Tumoren genauso wie in anderen Tumoren wie dem Mammakarzinom die ETS-1-Expression mit dem Malignitätsgrad korreliert. Aufgrund ihres raschen Wachstums generieren Glioblastome ein hypoxisches Milieu, was sich insbesondere in intratumoralen Nekrosen äußert.

Es existieren bis dato jedoch keine Arbeiten, die untersuchen, ob und inwieweit Hypoxie die ETS-1 Expression in Glioblastomen reguliert. Für Pankreasadenomzelllinien finden sich in der Literatur Daten, die eine Verminderung der ETS-1-Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen zeigen, so dass ein gewebespezifischer Effekt von Hypoxie auf die ETS-1-Expression anzunehmen ist. Darüber hinaus existieren in der Literatur hinsichtlich der lokalen Expression von ETS-1 in Glioblastomen bislang unterschiedliche Beschreibungen, die von einer Restriktion der ETS-1-Expression auf intratumorale Endothelzellen bis hin zu einer immunhistochemischen Nachweisbarkeit von ETS-1 in bis zu 90% aller Tumorzellen reichen.

Der erste Schritt dieser Arbeit war daher, mittels immunhistochemischer Färbungen die räumliche Verteilung der ETS-1-Expression zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine ETS-1-Reaktivität sowohl in Endothelzellen von Tumorkapillaren als auch den Tumorzellen selbst. In einem der untersuchten Tumore fand sich eine räumliche Korrelation von CD31-positiven Tumorkapillaren und der ETS-1-Expression im Tumorstroma. Dieser Zusammenhang war bisher nur in nicht glialen Tumorentitäten beschrieben und konnte in dieser Arbeit erstmals am Glioblastom gezeigt werden.

Mittels ergänzender immunzytochemischer Färbungen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass aus diesen Tumoren isolierte Zellen mit mesenchymalen Stammzeleigenschaften (gbMSLCs) ETS-1 exprimieren. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu der als Kontrolle verwendeten aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders gewonnenen mesenchymalen Stammzelllinie (bmMSC) eine intensivere Anfärbbarkeit, die auf eine vermehrte ETS-1-Expression hindeutet. Die erhöhte Expression von ETS-1 in den gbMSLCs ließ sich per Immunoblotting quantitativ verifizieren und auf mRNA-Ebene per PCR nachweisen.

Somit liefert diese Arbeit Hinweise, dass eine erhöhte ETS-1-Transkription und -Expression ein mögliches Unterscheidungsmerkmal zwischen physiologischen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und Glioblastomzellen mit vergleichbaren Stammzeleigenschaften ist.

Um der Frage nachzugehen, inwieweit die ETS-1-Expression in Glioblastomzellen hypoxieabhängig ist, wurde die ETS-1-Expression auf mRNA und Proteinniveau mittels RT-PCR und Immunoblotting nach 48h Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Bedingungen gemessen. Da sich in der Literatur Hinweise finden, dass Serum und Wachstumsfaktoren die ETS-1-Expression beeinflussen können, wurden die Versuche in serum- und wachstumsfaktorfreiem Medium durchgeführt. Hierbei zeigte sich in den Gliomzelllinien, gbMSLCs, bmMSC, isolierten Tumorendothellen (TUEC) sowie der etablierten Nabelschnurendothelzelllinie HUVEC weder auf transkriptionaler noch auf translationaler Ebene eine hypoxiebedingte Regulation der ETS-1-Expression. Für HUVEC findet sich in der Literatur eine Beschreibung einer Hypoxieabhängigkeit der ETS-1-Expression. Diese Versuche wurden jedoch unter wachstumsfaktorhaltigem Nährmedium durchgeführt. Somit ist zumindest ein synergistischer Effekt von Hypoxie mit Serumbestandteilen und Wachstumsfaktoren denkbar. Hypoxie alleine jedoch reicht nicht aus um die ETS-1-Expression in den untersuchten Zelllinien signifikant zu beeinflussen. Dies spricht, insbesondere unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Qiao et al., die eine Verminderung der ETS-1-Proteinexpression in Pankreasadenomzelllinien unter Hypoxie nachweisen konnten, für einen gewebespezifischen Effekt von Hypoxie auf die ETS-1-Expression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die ETS-1-Expression in Glioblastomen nicht nur eine Antwort auf die intratumorale Hypoxie ist, sondern auch durch andere Einflussfaktoren bedingt ist. Da ETS-1 nachweislich die Invasivität von Glioblastomzellen steigert, stellt es einen vielversprechenden Ansatzpunkt für eine gezielte therapeutische Intervention dar. Hierfür sollte in weiterführenden Experimenten die ETS-1-Regulation im Glioblastom weiter charakterisiert werden. So stellt sich in Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit insbesondere die Frage, ob und inwieweit Hypoxie die Wirkung von Serum oder Wachstumsfaktoren auf die ETS-1-Expression in Glioblastomzellen potenzieren kann.

8 Literaturverzeichnis

1. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013*. Neuro-Oncology, 2016. **18**(suppl_5): p. v1-v75.
2. Parpura, V., et al., *Glial cells in (patho)physiology*. J Neurochem, 2012. **121**(1): p. 4-27.
3. Bailey, P.C., H., *A classification of the tumors of the glioma group on an histogenetic basis with a correlated study of prognosis*. 1926, Philadelphia, London, Montreal: J. B. Lippincott Company.
4. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
5. Soffietti, R., et al., *Guidelines on management of low-grade gliomas: report of an EFNS-EANO Task Force*. Eur J Neurol, 2010. **17**(9): p. 1124-33.
6. Stupp, R., et al., *High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii93-101.
7. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
8. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
9. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
10. Thomas, R.P., L. Recht, and S. Nagpal, *Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing*. Clin Pharmacol, 2013. **5**: p. 1-9.
11. Giese, A., *Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumorsuppressor p53 and proto-oncogene ETS-1*. Acta Neurochir Suppl, 2003. **88**: p. 153-62.
12. Miller, C.R. and A. Perry, *Glioblastoma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(3): p. 397-406.
13. Lun, M., et al., *The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme*. J Neurooncol, 2011. **105**(2): p. 261-73.
14. Matsukado, Y., C.S. Maccarty, and J.W. Kernohan, *The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice*. J Neurosurg, 1961. **18**: p. 636-44.
15. Sturm, D., et al., *Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma*. Cancer Cell, 2012. **22**(4): p. 425-37.
16. Hartmann, C., et al., *Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(18): p. 5146-57.
17. Kim, W. and L.M. Liau, *IDH mutations in human glioma*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(3): p. 471-80.
18. Hartmann, C., et al., *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(6): p. 707-18.
19. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
20. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
21. Hegi, M.E., et al., *Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4189-99.

22. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
23. Posti, J.P., et al., *Presenting symptoms of glioma in adults*. Acta Neurol Scand, 2015. **131**(2): p. 88-93.
24. Preusser, M., et al., *Current concepts and management of glioblastoma*. Ann Neurol, 2011. **70**(1): p. 9-21.
25. Fomchenko, E.I. and E.C. Holland, *Stem cells and brain cancer*. Exp Cell Res, 2005. **306**(2): p. 323-9.
26. Ellingson, B.M., et al., *Pseudoprogression, radionecrosis, inflammation or true tumor progression? challenges associated with glioblastoma response assessment in an evolving therapeutic landscape*. J Neurooncol, 2017. **134**(3): p. 495-504.
27. Ahmed, R., et al., *Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods*. Cancer Manag Res, 2014. **6**: p. 149-70.
28. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 459-66.
29. Sanai, N., *Emerging operative strategies in neurosurgical oncology*. Curr Opin Neurol, 2012. **25**(6): p. 756-66.
30. Keles, G.E., B. Anderson, and M.S. Berger, *The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere*. Surg Neurol, 1999. **52**(4): p. 371-9.
31. Pope, W.B., et al., *MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas*. AJNR Am J Neuroradiol, 2005. **26**(10): p. 2466-74.
32. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. J Neurosurg, 2001. **95**(2): p. 190-8.
33. Sanai, N., et al., *An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas*. J Neurosurg, 2011. **115**(1): p. 3-8.
34. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 392-401.
35. Ryken, T.C., et al., *The role of cytoreductive surgery in the management of progressive glioblastoma : a systematic review and evidence-based clinical practice guideline*. J Neurooncol, 2014. **118**(3): p. 479-88.
36. Hochberg, F.H. and A. Pruitt, *Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma*. Neurology, 1980. **30**(9): p. 907-11.
37. Wallner, K.E., et al., *Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989. **16**(6): p. 1405-9.
38. Choucair, A.K., et al., *Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas*. J Neurosurg, 1986. **65**(5): p. 654-8.
39. Narayana, A., et al., *Intensity-modulated radiotherapy in high-grade gliomas: clinical and dosimetric results*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **64**(3): p. 892-7.
40. Shrieve, D.C., et al., *Treatment of patients with primary glioblastoma multiforme with standard postoperative radiotherapy and radiosurgical boost: prognostic factors and long-term outcome*. J Neurosurg, 1999. **90**(1): p. 72-7.
41. Prisco, F.E., et al., *Radiosurgical boost for primary high-grade gliomas*. J Neurooncol, 2002. **57**(2): p. 151-60.
42. Nwokedi, E.C., et al., *Gamma knife stereotactic radiosurgery for patients with glioblastoma multiforme*. Neurosurgery, 2002. **50**(1): p. 41-6; discussion 46-7.
43. Gilbert, M.R., et al., *A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma*. N Engl J Med, 2014. **370**(8): p. 699-708.
44. Chinot, O.L., et al., *Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma*. N Engl J Med, 2014. **370**(8): p. 709-22.

45. Gilbert, M.R., et al., *Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(32): p. 4085-91.
46. Stupp, R., et al., *Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(10): p. 1100-8.
47. Taal, W., et al., *Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(9): p. 943-53.
48. Wick, W., et al., *Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma*. N Engl J Med, 2017. **377**(20): p. 1954-1963.
49. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Modelling the molecular circuitry of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 331-41.
50. Grander, D., *How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?* Med Oncol, 1998. **15**(1): p. 20-6.
51. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
52. Bertram, J.S., *The molecular biology of cancer*. Mol Aspects Med, 2000. **21**(6): p. 167-223.
53. Shackney, S.E. and T.V. Shankey, *Common patterns of genetic evolution in human solid tumors*. Cytometry, 1997. **29**(1): p. 1-27.
54. Friedberg, E.C., L.D. McDaniel, and R.A. Schultz, *The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): p. 5-10.
55. Kelliher, M., et al., *Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish the two forms of the BCR/ABL oncogene*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(9): p. 4710-6.
56. Renan, M.J., *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data*. Mol Carcinog, 1993. **7**(3): p. 139-46.
57. Colburn, N.H., E. Wendel, and L. Srinivas, *Responses of preneoplastic epidermal cells to tumor promoters and growth factors: use of promoter-resistant variants for mechanism studies*. J Cell Biochem, 1982. **18**(3): p. 261-70.
58. zur Hausen, H., *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(9): p. 690-8.
59. Fournier, A., et al., *Risks of endometrial cancer associated with different hormone replacement therapies in the E3N cohort, 1992-2008*. Am J Epidemiol, 2014. **180**(5): p. 508-17.
60. Fazeli, G., et al., *Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4*. Mutagenesis, 2012. **27**(6): p. 673-81.
61. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
62. Marjanovic, N.D., R.A. Weinberg, and C.L. Chaffer, *Cell plasticity and heterogeneity in cancer*. Clin Chem, 2013. **59**(1): p. 168-79.
63. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
64. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
65. Patrawala, L., et al., *Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells*. Oncogene, 2006. **25**(12): p. 1696-708.
66. Harrison, H., et al., *Breast cancer stem cells: something out of notching?* Cancer Res, 2010. **70**(22): p. 8973-6.
67. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
68. Lathia, J.D., et al., *Cancer stem cells in glioblastoma*. Genes Dev, 2015. **29**(12): p. 1203-17.

69. Ignatova, T.N., et al., *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. *Glia*, 2002. **39**(3): p. 193-206.
70. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
71. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
72. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
73. Chen, J., et al., *A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy*. *Nature*, 2012. **488**(7412): p. 522-6.
74. Bao, S., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 756-60.
75. Lee, H.Y. and I.S. Hong, *Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential*. *Cancer Sci*, 2017. **108**(10): p. 1939-1946.
76. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
77. Maxson, S., et al., *Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair*. *Stem Cells Transl Med*, 2012. **1**(2): p. 142-9.
78. Ridge, S.M., F.J. Sullivan, and S.A. Glynn, *Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 31.
79. Kolosa, K., et al., *Paracrine effects of mesenchymal stem cells induce senescence and differentiation of glioblastoma stem-like cells*. *Cell Transplant*, 2015. **24**(4): p. 631-44.
80. Hossain, A., et al., *Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway*. *Stem Cells*, 2015. **33**(8): p. 2400-15.
81. Ho, I.A., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis*. *Stem Cells*, 2013. **31**(1): p. 146-55.
82. Kong, B.H., et al., *Increased in vivo angiogenic effect of glioma stromal mesenchymal stem-like cells on glioma cancer stem cells from patients with glioblastoma*. *Int J Oncol*, 2013. **42**(5): p. 1754-62.
83. Dasari, V.R., et al., *Upregulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/Akt pathway*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10350.
84. Jiao, H., et al., *Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis in vivo through the Bcl-2/caspase pathways*. *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(1): p. 467-73.
85. Lee, T.I. and R.A. Young, *Transcription of eukaryotic protein-coding genes*. *Annu Rev Genet*, 2000. **34**: p. 77-137.
86. Latchman, D.S., *Transcription factors: an overview*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997. **29**(12): p. 1305-12.
87. Babu, M.M., et al., *Structure and evolution of transcriptional regulatory networks*. *Curr Opin Struct Biol*, 2004. **14**(3): p. 283-91.
88. Hahne, J.C., et al., *The transcription factor ETS-1: its role in tumour development and strategies for its inhibition*. *Mini Rev Med Chem*, 2008. **8**(11): p. 1095-105.
89. Leprince, D., et al., *A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26*. *Nature*, 1983. **306**(5941): p. 395-7.
90. Nunn, M.F., et al., *Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene*. *Nature*, 1983. **306**(5941): p. 391-5.
91. Watson, D.K., et al., *The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(21): p. 7294-8.

92. Wasylyk, B., S.L. Hahn, and A. Giovane, *The Ets family of transcription factors*. Eur J Biochem, 1993. **211**(1-2): p. 7-18.
93. Nye, J.A., et al., *Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif*. Genes Dev, 1992. **6**(6): p. 975-90.
94. Boulukos, K.E., et al., *Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(12): p. 5718-21.
95. Takai, N., et al., *Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma*. Cancer, 2000. **89**(10): p. 2059-67.
96. Dittmer, J., *The biology of the Ets1 proto-oncogene*. Mol Cancer, 2003. **2**: p. 29.
97. Czuwara-Ladykowska, J., et al., *Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 20839-48.
98. Foulds, C.E., et al., *Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10954-64.
99. Yang, B.S., et al., *Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(2): p. 538-47.
100. Hahne, J.C., et al., *Regulation of protein tyrosine kinases in tumour cells by the transcription factor Ets-1*. Int J Oncol, 2009. **35**(5): p. 989-96.
101. Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.
102. Li, R., H. Pei, and D.K. Watson, *Regulation of Ets function by protein - protein interactions*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6514-23.
103. Kim, E., et al., *Tumor suppressor p53 inhibits transcriptional activation of invasion gene thromboxane synthase mediated by the proto-oncogenic factor ets-1*. Oncogene, 2003. **22**(49): p. 7716-27.
104. Garrett-Sinha, L.A., *Review of Ets1 structure, function, and roles in immunity*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(18): p. 3375-90.
105. Mamori, S. and H. Tajiri, *Ets-1 is increased in anticancer drug-containing media and hypoxic cultures, similar to TACE*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(4): p. 507-8.
106. Oikawa, M., et al., *Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(1): p. 39-43.
107. Qiao, N., et al., *Ets-1 as an early response gene against hypoxia-induced apoptosis in pancreatic beta-cells*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1650.
108. Vandembunder, B., et al., *Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myc and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo*. Development, 1989. **107**(2): p. 265-74.
109. Remy, P. and M. Baltzinger, *The Ets-transcription factor family in embryonic development: lessons from the amphibian and bird*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6417-31.
110. Wernert, N., et al., *c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans*. Am J Pathol, 1992. **140**(1): p. 119-27.
111. Fafeur, V., et al., *The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(6): p. 655-65.
112. Tahtakran, S.A. and M.A. Selleck, *Ets-1 expression is associated with cranial neural crest migration and vasculogenesis in the chick embryo*. Gene Expr Patterns, 2003. **3**(4): p. 455-8.
113. Chen, J.H., *The proto-oncogene c-ets is preferentially expressed in lymphoid cells*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(11): p. 2993-3000.
114. Grenningloh, R., et al., *Ets-1 maintains IL-7 receptor expression in peripheral T cells*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 969-76.
115. Mouly, E., et al., *The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells*. J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2113-25.

116. Wang, D., et al., *Ets-1 deficiency leads to altered B cell differentiation, hyperresponsiveness to TLR9 and autoimmune disease*. Int Immunol, 2005. **17**(9): p. 1179-91.
117. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
118. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
119. Simons, M., E. Gordon, and L. Claesson-Welsh, *Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(10): p. 611-25.
120. Carmeliet, P., *VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis?* Nat Med, 2000. **6**(10): p. 1102-3.
121. Hillen, F. and A.W. Griffioen, *Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 489-502.
122. Adam, M., et al., *Angiogenetic protooncogene ets-1 induced neovascularization is involved in the metastatic process of testicular germ cell tumors*. Eur Urol, 2003. **44**(3): p. 329-36.
123. Khatun, S., et al., *Clinical implications of expression of ETS-1 in relation to angiogenesis in ovarian cancers*. Cancer Sci, 2003. **94**(9): p. 769-73.
124. Pourtier-Manzanedo, A., et al., *Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model*. Oncogene, 2003. **22**(12): p. 1795-806.
125. Wernert, N., et al., *Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion*. Cancer Res, 1994. **54**(21): p. 5683-8.
126. Sato, Y., et al., *Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 201-5; discussion 205-7.
127. Kiriakidis, S., et al., *Novel tempeh (fermented soyabean) isoflavones inhibit in vivo angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane assay*. Br J Nutr, 2005. **93**(3): p. 317-23.
128. Kita, D., et al., *Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line*. Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7985-91.
129. Yasuda, M., et al., *The involvement of integrin alphavbeta3 in polymorphonuclear leukocyte-induced angiogenesis in bovine aortic endothelial cells*. Life Sci, 2004. **75**(4): p. 421-34.
130. Lelievre, E., et al., *ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin*. Oncogene, 2000. **19**(20): p. 2438-46.
131. Wernert, N., et al., *Inhibition of Angiogenesis In Vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin*. Angew Chem Int Ed Engl, 1999. **38**(21): p. 3228-3231.
132. Ozaki, I., et al., *Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1*. Hepatol Res, 2003. **27**(4): p. 289-301.
133. Yasuda, M., et al., *Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells*. Life Sci, 1999. **64**(4): p. 249-58.
134. Chen, Z., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides*. Cancer Res, 1997. **57**(10): p. 2013-9.
135. Behrens, P., et al., *The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer*. J Pathol, 2001. **194**(1): p. 43-50.
136. Hahne, J.C., et al., *Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth*. Oncogene, 2005. **24**(34): p. 5384-8.
137. Wernert, N., *The multiple roles of tumour stroma*. Virchows Arch, 1997. **430**(6): p. 433-43.
138. Kitange, G., et al., *Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors*. Mod Pathol, 1999. **12**(6): p. 618-26.

139. Fleischman, L.F., et al., *ets-1 in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): p. 925-31.
140. Valter, M.M., et al., *Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis*. Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5608-14.
141. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
142. Erber, R., et al., *Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms*. FASEB J, 2004. **18**(2): p. 338-40.
143. Behrens, P., et al., *Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers*. Int J Cancer, 2003. **107**(2): p. 183-8.
144. Behrens, P., et al., *Invasive properties of serous human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1 and MMP-9 expression*. Int J Mol Med, 2001. **8**(2): p. 149-54.
145. Shih, T. and C. Lindley, *Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies*. Clin Ther, 2006. **28**(11): p. 1779-802.
146. Gotink, K.J. and H.M. Verheul, *Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?* Angiogenesis, 2010. **13**(1): p. 1-14.
147. Cook, K.M. and W.D. Figg, *Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(4): p. 222-43.
148. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(26): p. 2473-83.
149. Perren, T.J., et al., *A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(26): p. 2484-96.
150. Hahne, J.C., et al., *Identification of ETS-1 target genes in human fibroblasts*. Int J Oncol, 2011. **38**(6): p. 1645-52.
151. Rothhammer, T., et al., *The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(1): p. 118-28.
152. Amouyel, P., et al., *Expression of ETS proto-oncogenes in astrocytes in human cortex*. Brain Res, 1988. **447**(1): p. 149-53.
153. Kitange, G., et al., *Ets-1 transcription factor-mediated urokinase-type plasminogen activator expression and invasion in glioma cells stimulated by serum and basic fibroblast growth factors*. Lab Invest, 1999. **79**(4): p. 407-16.
154. Nakada, M., et al., *Ets-1 positively regulates expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and invasiveness of astrocytic tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(4): p. 329-34.
155. Yamamoto, H., et al., *Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity*. Cancer Res, 2000. **60**(1): p. 134-42.
156. Ohnishi, T., et al., *Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(8): p. 729-41.
157. Yan, S., et al., *Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma*. DNA Cell Biol, 2000. **19**(2): p. 79-91.
158. Cheng, S.M., et al., *Interferon-gamma regulation of TNFalpha-induced matrix metalloproteinase 3 expression and migration of human glioma T98G cells*. Int J Cancer, 2007. **121**(6): p. 1190-6.
159. Sahin, A., et al., *Dominant-negative inhibition of Ets 1 suppresses tumor growth, invasion and migration in rat C6 glioma cells and reveals differentially expressed Ets 1 target genes*. Int J Oncol, 2009. **34**(2): p. 377-89.
160. Sahin, A., et al., *Inactivation of Ets 1 transcription factor by a specific decoy strategy reduces rat C6 glioma cell proliferation and mmp-9 expression*. Int J Mol Med, 2005. **15**(5): p. 771-6.

161. Otsu, K., et al., *Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4197-205.
162. Schichor, C., et al., *Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro*. Exp Neurol, 2012. **234**(1): p. 208-19.
163. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
164. Calabrese, C., et al., *A perivascular niche for brain tumor stem cells*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 69-82.
165. Yang, L., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications*. Exp Cell Res, 2012. **318**(19): p. 2417-26.
166. Iwasaka, C., et al., *Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells*. J Cell Physiol, 1996. **169**(3): p. 522-31.
167. Holterman, C.E., et al., *ETS-1 oncogenic activity mediated by transforming growth factor alpha*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 730-40.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Identifikation ETS-1-positiver primärer Glioblastome	39
Abb. 2 Korrelation der CD31-Expression mit der ETS-1-Expression, exemplarisch illustriert an Tumor TB771	40
Abb. 3 Immunzytochemische Färbung der gbMSLCs für ETS-1	42
Abb. 4 Immunzytochemische Färbung der kommerziell erhältlichen Gliomzelllinien für ETS-1	43
Abb. 5 Densitometrische Auswertung der ETS-1-mRNA-Expression in kommerziell erhältlichen Gliomzelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie	44
Abb. 6 RT-PCR ETS-1-mRNA Expression in kommerziell erhältlichen Gliomzelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie.....	45
Abb. 7 Densitometrische Auswertung der ETS-1-mRNA Expression gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie.....	46
Abb. 8 RT-PCR der ETS-1-mRNA-Expression in gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie	46
Abb. 9 Densitometrische Auswertung ETS-1-Expression Western Blot kommerzielle Zelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie.....	48
Abb. 10 Western Blot ETS-1-Expression kommerzielle Gliomzelllinien unter Normoxie vs. Hypoxie	48
Abb. 11 Densitometrische Auswertung ETS-1-Expression Western Blot gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie	49
Abb. 12 Western Blot ETS-1-Expression gbMSLC und bmMSC unter Normoxie vs. Hypoxie	49
Abb. 13 Densitometrische Auswertung ETS-1-mRNA Expression Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie.....	51
Abb. 14 RT-PCR ETS-1-mRNA Expression Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie	51
Abb. 15 Densitometrische Auswertung ETS-1-Expression Western Blot Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie.....	52
Abb. 16 Western Blot ETS-1-Expression Endothelzellen unter Normoxie vs. Hypoxie.....	52

10 Anhang

10.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller
Autoklav	KSG
Brutschrank APT. Line CB	Binder
Brutschrank	Heraeus
Digitale Geldokumentation	Serva
Digitalkamera Power Shot G2	Canon
Einfrierbox für Kryoröhrchen	Nunc
Entwicklermaschine Scopix LR 5200	Agfa
Gefrierschrank -80°C HFU 86450	Heraeus
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr
Glashomogenisator	Braun
Glasmesszylinder	Schott
Handstückzähler mechanisch	VWR
Kühlschrank Comfort	Liebherr
Kühlschrank Economy	Liebherr
Laminar flow hood Hera safe	Heraeus
Magnet Particle Separator	Roche
Magnetrührer VMS-C7	VWR
Messgläser	VWR Brand
Mikroplate Reader Versa max	Molecular Devices
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss
Mikrotom	Pfm medicals
Mikrowellenherd	Toshiba
MilliQ-biocel A10	Millipore
Minishaker MS2	IKA Labortechnik
Multipette	Eppendorf
PCR Cycler Mastercycler Personal	Eppendorf
pH-Elektrode Sen Tix 41	VWR
Photometer	Eppendorf
Pipetten (10, 20, 200 1000µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Power Pac 300	Bio Rad

Röhrchengestell	TPP
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Stickstofftank Chronos	Messer
Vortex-Mixer	VWR
Waage PB 3002	Mettler Toledo
Wärmeschränk	Heraeus
Wasserbad	Memmert
Zählkammer Neubauer improved	VWR
Zellsuspensionsrotator	Labor Brand
Zentrifuge 1-15	Sigma
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich

10.2 Verbrauchsmaterialien

Steri-Indikatorband 19mm x 50 m	Wagner & Munz
5L Kanister blau zur Entsorgung / Abfallbehälter	SES
Becherglas 50 ml	Schott Duran
Becherglas 150 ml	Schott Duran
Becherglas 250ml	Schott Duran
Becherglas 400ml	Schubert & Weiß
Becherglas 600ml	VWR
Becherglas 1000ml	VWR
Cryoröhrchen Nunc 1,8ml (Bestnr.: 375418)	VWR
Deckgläser für Haemocytom (für Neubauer Zählkammer)	ZEFA Laborservice
Entsorgungsbox (gelb für Kanülen ect.)	Heisig
Präzisionstuch Kimwipes Lite 115x215mm (rote Boxen)	ZEFA Laborservice
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 500 ml	Schubert & Weiß
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 250 ml	PESKE
Laborflasche klar mit Schraubverschluss 100 ml, Ring aus PP (blau)	PESKE
Laborflasche braun mit Gewinde 50 ml	Wagner & Munz
Meßzylinder 1000ml:10ml graduert, mit Ausguß + Sechskantfuss	Wagner & Munz
Meßzylinder 100ml:1,0ml graduert, mit Ausguß + Sechskantfuss	ZEFA Laborservice
Müllbehälter 50L gelb	REMONDIS Medison
Objektträger 76x26 Superfrost	Wagner & Munz
Petrischale	Wagner & Munz
Pipette Serol. 10ml	Costar
Pipette Serol. 25ml	Schubert & Weiß
Pipette Serol. 5ml	Costar
Pipettenspitze blau 1000µl	Sarstedt
Pipettenspitzen Eppendorf crystal 0,5-20µl steril	Neolab

Präparatekasten schwarz f. 100 Objektträger	ZEFA Laborservice
Präparatmappe grau mit Deckel für 20 OT (Pappe)	Wagner & Munz
Reaktionsgefäß mit Deckel schwergängig 1,5 ml (Eppis)	Sarstedt
Reaktionsgefäß safe lock 2 ml (Eppis)	Sarstedt
Reaktionsgefäß safe lock farbl. 0,5 ml (Eppis)	Sarstedt
Falconröhrchen 15ml	TPP
Falconröhrchen blau 50ml	BD
Wägepapier 133 x 100 mm	ZEFA Laborservice
Einweg Wägeschiffchen klein Polystyrol	Schubert & Weiß
Einweg Wägeschiffchen mittel Polystyrol	VWR
Zellstofftücher Kimberly/Clark (blau)	Bauer Papier
Poly-Flachbeutel 80 x 120 mm transparent	Günther D.U.E.
BD Microlance Kanülen gelb 20G 0,9 x 40 mm	BD
BD Microlance Kanülen grau 22G 0,7 x 30 mm	BD
Krankenunterlage 40x60cm Molinea Plus-E	Molinea
Krankenunterlagen 60x90cm Molinea Plus	Molinea
Nitrilhandschuhe pud.fr. latexfrei L	Safe Skin
Skalpelle steril Größe 11	Braun
Skalpelle steril Größe 15	Braun
Skalpelle steril Größe 20	Braun
Skalpelle steril Größe 23	Braun
Spritzen (10 ml)	Braun
Spritzen Perfusor 50ml	Codan

10.3 Zellkultur

Zellsieb 30µm	Miltenyi Biotech
Zellsieb 40µm blau	BD Falcon
Zellsieb 70µm blau	BD Falcon
Fetales Kälberserum (FCS)(Charge 0344X)	Biochrom AG
DMEM - Medium 1,0 g/L + L-Glutamin	Biochrom AG
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG

Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom AG
Trypsin/ EDTA (10x) (0,5%/0,2%)	Biochrom AG
DMEM 1 g/L Glucose	Cambrex / BioWhittaker
Medium 199 Earl's BSS	Cambrex / BioWhittaker
DPBS	Cambrex / BioWhittaker
MEM Eagle NEAA (100x)	Cambrex / BioWhittaker
D-PBS (1x) + CaCl ₂ und MgCl ₂	Invitrogen / Gibco
Gentamycin 10 mg/ml (für Endothelzellen)	Invitrogen / Gibco
MEM 100x	Invitrogen / Gibco
Pen/Strep/Glut Lösung	Invitrogen / Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MERCK
Einfrierbox für Kryoröhrchen Nunc	Nunc
Microvascular endothelial cell growth medium, advanced	Provitro
Collagenase/ Dispase	Roche
DNase I	Roche
MTT	Sigma
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma
Dextran	Sigma
Filterschraubkappen für 25cm ² ZK-Flasche	TPP
Filterschraubkappen für 75cm ² ZK-Flasche	TPP
Filterschraubkappen für 150cm ² ZK-Flasche	TPP
Zellkulturflasche TPP mit Filter 25cm ²	TPP
Zellkulturflasche TPP mit Filter 75cm ²	TPP
Zellkulturflasche TPP mit Filter 150cm ²	TPP
Zellkulturtestplatte 96-well	TPP

10.4 Immunzytochemie/-histochemie

AEC-Kit	Sigma
AquaTex	Merck
Antikörper Verdünnungsmedium	Dako
Brij	Merck
Citratpuffer (10x,) pH6	Dako
Eosin	Sigma
Entellan	Merck
Ethylen Glycol	Sigma

DAB Substrat-Chromogen System	Dako
Glycerol	Sigma
Hope I & II Lösung	DCS LabLine
NP 40	Roche
Universal LSAB2-Kit	Dako
Peroxidase Blocking Reagenz	Dako
Protein Blocking Reagenz	Dako
Roti-Histol	Roth
Streptavidin HRP konjugiert	Dako
Tween 20	Dako
LSAB Biotinylated AB	Dako
Aceton reinst	Roth
Citronensäure Monohydrat	Sigma
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O)	Sigma
Mayer's Hämalun Lösung	Merck
Methanol P.A.	Merck
Ethanol absolut (vergällt)	Klinikapotheke
Ethanol 96% (vergällt)	Klinikapotheke
Ethanol 70% (vergällt)	Klinikapotheke
PBS Puffer pH 7,4 (10x)	Klinikapotheke
Perhydrol (Wasserstoffperoxid) 30%ig	VWR
2-Propanol	Roth
Xylol	Merck
Kaisers Glyceringelatine	Merck

10.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Agarose	Sigma
Borsäure	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
DEPC Treated Water Pyrogen-free	Invitrogen
Gene Ruler 50bp DNA-Ladder	Fermentas

Hot Star Taq Master Mix Kit 1000 Units	Qiagen
Pipettenspitzen gefiltert (10, 20, 200, 1000µl) Max. Recovery	Abimed
Reaktionsgefäße-Soft Tubes(1,5 und 2ml) PCR clean	Eppendorf
0,2ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
Tris-HCl	Sigma
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
Qiashredder (50)	Qiagen
UVette [®]	Eppendorf
6x Loading Buffer	Novagen

10.6 Western Blot

Immun-Blot PVDF-Membran (26 cm x 3,3 m)	BioRad
Immunstar Luminol Enhancer ECL und HRP Peroxid-Puffer	Thermo Scientific
Marker: Presicion Plus Protein Marker	Invitrogen
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	BioRad
Lämmli Puffer	BioRad
Quickstart BSA Standard Set	BioRad
Quickstart Bradford Dye Reagent	BioRad
Mini Trans Blot Electrophoretic Transfercell	BioRad
Mini Trans Blot Filter Paper (7,5 x 10 cm)	BioRad
Fiberpads (8 x 11 cm)	BioRad
Flachbeutel PE 115 x 155 mm	Boll
Tween 20	Sigma
Röntgenfilm Super X-Ray RX 18 x 24 cm	Fuji
Methanol reinst	Roth
Salzsäure (HCl) 2 mol/l	Merck
Nonidet P40	Roche
Magermilchpulver	Roth

β-Mercaptoethanol	Sigma
Rinderalbumin (BSA)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma
Acrylamid (AA)	Thermo Scientific
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
PIC I (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Sigma
PIC II (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Sigma
Tris (TRIZMA-Base)	Sigma
TRIZMA hydrochloride	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma

10.7 Antikörper

10.7.1 Immunhistochemie/-zytochemie

Antigen	Zusatz	Hersteller	Konzentration
CD 31	Mouse anti human	Dako	1:100
ETS-1	Rabbit anti human	Santa Cruz	1:1500/1:2000
IDH1 mut	Rat anti human	Dianova	1:100

10.7.2 Western Blot

Antigen	Zusatz	Hersteller	Konzentration
β-Actin	Mouse anti human	Sigma	1:5000
ETS-1	Mouse anti human	Millipore	1:1000

10.8 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Ursprungsgewebe	Firma
U87	Human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
U251	Human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
U373	Human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
HUVEC	Human	Endothelzellen aus humaner Nabelschnur	Provitro

gbMSLC	Human	Selbst isolierte mesenchymale Zellen mit Stammzeleigenschaften (glioblastoma derived mesenchymal stem cell like cells) aus GBM	
bmMSC	Human	Selbst isolierte mesenchymale Stammzellen bone marrow derived mesenchymal stem cells) aus Knochenmark gesunder Spender	
TuEC	Human	Selbst isolierte Endothelzellen aus GBM	

10.9 Nährmedien

10.9.1 Nährmedien Zellkultur

Endothelzellmedium (ECM) + Supplements (für HUVEC und TUEC) 500ml Microvascular endothelial cell growth medium, FCS-Kit advanced (Provitro)
5ml Pen/ Strep (Gibco)

DMEM + 10% FCS (für humane Gliomzelllinien U87, U251, U373)

435ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG)
5ml Pen/ Strep (Gibco)
5ml Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) (Gibco)
50ml FCS (Biochrom AG)

DMEM + 20% FCS (für selbst isolierte mesenchymale Zelllinien gbMSLC und bmMSCLC)

385ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG)
5ml Pen/ Strep (Gibco)
5ml Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) (Gibco)
100ml FCS (Biochrom AG)

10.9.2 Nährmedien Hypoxieversuche

Endothelzellmedium (ECM) 500ml Microvascular endothelial cell growth medium, advanced ohne mitgeliefertes Supplement Kit (Provitro)
5ml Pen/ Strep (Gibco)

DMEM (für alle Zellen außer Endothelzellen)

485ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG)
5ml Pen/ Strep (Gibco)
5ml Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) (Gibco)

10.9.3 Einfriermedium

40ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG) ohne Antibiotika
40ml FCS (Biochrom AG)
20ml DMSO (Merck)

10.9.4 Isolationsmedium Endothelzellen

437,5ml M199 (LONZA)
50ml FCS (Biochrom AG)
12,5ml Pen/ Strep (Gibco)

10.10 Lösungen für IHC/ICC

Citratlösung- Stammlösung A 18 ml 0.1M Citronensäure Monohydrat

Stammlösung B

82 ml 0.1M Tri-Natriumcitrat 900 ml H₂O_{dest.}

Tris-Puffer

50mM Tris 0,3M NaCl 0,1% Tween; pH= 7,6

10.11 Lösungen für PCR

TBE-Puffer (5x TBE) 54g Tris-Base 27,5g Borsäure

20ml 0,5M EDTA ad 1l H₂O

RNA-Puffer zur photometrischen Vermessung 10nM TRIS-HCl

0,0778g TRIS -HCl ad 50ml DEPC- H₂O

10.12 Lösungen für Western Blot

Lysepuffer NP40 + Protease Inhibitor Cocktail + Phosphatase Inhibitor Cocktail 0,16g 20mM Tris-HCl 0,40g 137mM NaCl 0,037g 2mM EDTA 5ml 10% Glycerol 500µl 1% Nonidet P40 90µl Protease Inhibitor Cocktail 90µl Phosphatase Inhibitor Cocktail ad 50ml H₂O_{dest}

Elektrophorese-Puffer (1x EP)

3,94g/l Tris-HCl 14,4g/l Glycin 10ml/l 10%ig SDS-Lösung ad 1l H₂O_{dest} pH auf 8,3 mit NaOH (1mol/l) einstellen

10x Transferpuffer (10x TB)

29,3g 390mM Glycin 58,2g 480mM Tris-Base 1,3mM (0,3%) SDS 37,5ml einer 10%igen SDS-Lösung ad 1l H₂O

1x Transferpuffer (1x TB)

100ml 10x TB 200ml Methanol 700ml H₂O_{dest}

10x Tris-Buffered-Saline (10x TBS)

20mM Tris-HCl 29,1g 500mM NaCl 58,2g ad 1l H₂O_{dest} pH auf 7,5 mit NaOH (1mol/l) kalibrieren

1x Tris-Buffered-Saline (1x TTBS mit 0,05% Tween 20)

100ml 10x TBS 900ml H₂O_{dest} 350µl Tween 20

Blockierlösung

Milchpulver 3g 60ml TTBS

Inkubationslösung

Blockierlösung 10ml TTBS 190ml

7,5%-iges Trenngel:

85ml H₂O_{dest}, 2,5ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8 100µl 10%-ige SDS-Lösung 2,5ml 30%-iges Acrylamid 100µl 10%-iges Ammoniumpersulfat (APS) 10µl TEMED

4%-iges Sammelgel:

6,1ml H₂O_{dest} 2,5ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8 100µl 10%-ige SDS-Lösung 1,3ml 30%-iges Acrylamid 100µl 10%-iges APS 10µl TEMED

Stripping-Puffer

12,5 ml 0,5M Tris-HCl 20 ml 10%-ige SDS-Lösung 800µl β-Mercaptoethanol ad 67,5ml H₂O_{dest}

11 Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalarbeit veröffentlicht:

Koessinger D, Albrecht V, Faber F, Jaehnert I, Schichor C. ETS-1 Expression Is Hypoxia-independent in Glioblastoma-derived Endothelial and Mesenchymal Stem-like Cells. Anticancer Res. 2018;38(6):3347-3355.

12 Danksagung

An Herrn Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn für die Möglichkeit, meine Dissertation in dem Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik durchführen zu können.

An meinen Doktorvater PD Dr. med. Christian Schichor für die ausdauernde Betreuung und zahlreiche fruchtbare Projektbesprechungen.

An meinen Betreuer Dr. med. Florian Faber für die Hilfe bei der Projektplanung und die Hilfestellungen bei der Projektumsetzung.

An Frau Dr. rer. nat. Valerie Albrecht für die geduldige Einweisung in vielerlei Labortechniken, hilfreiche Projektdiskussionen und maßgebliche Hilfestellung bei der Fertigstellung des Papers.

An Frau Dr. rer. nat. Irene Jaehnert und Frau Anja Niedermeier für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots.

An Frau BTA Sabrina Lakotta für das stets offene Ohr und die Einweisung und Hilfe bei Zellkultur und Immunhistochemie.

An Frau MTA Stefanie Lange für die stets freundliche Unterstützung und Hilfe.

An meine Eltern, die mich bei der Durchführung dieser Dissertation stets unterstützt haben.

An meine Frau, die mir allzeit den Rücken gestärkt hat und insbesondere bei der Fertigstellung dieser Arbeit ein stets geduldiger und hilfreicher Diskussionspartner war.

13 Eidesstattliche Versicherung

Kössinger, Dominik Andreas

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von ETS-1 in primären Glioblastomen -
Zellsubtypen-Analyse mit besonderem Augenmerk auf Tumorzellen mit
mesenchymalen Stammzeleigenschaften**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Glasgow, 22.04.2019

gez. Dominik Andreas Kössinger